

**VORKOMMEN VON ARZNEIMITTELRESISTENZ
UND COLICINOGENIE BEI E. COLI – STÄMMEN**

Eberhard Schäl

—

1975

Dissertationsdruck

Blasaditsch GmbH • 89 Augsburg 17 • Theodor-Heuß-Platz 3 • Telefon (0821) 51 85 63

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
im Fachbereich Tiermedizin der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr
Arbeit angefertigt unter Leitung von Frau Prof. Dr. B. Gedek

VORKOMMEN VON ARZNEIMITTELRESISTENZ UND COLICINOGENIE
BEI E. COLI - STÄMMEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des
Fachbereichs Tiermedizin
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Eberhard Schäl
aus
Heidenheim
München 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität
München



Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. B. Gedek
Korreferent: Prof. Dr. A. Petter

Tag der Promotion: 18. Juli 1975

INHALTSVERZEICHNIS

1. VORWORT	3
2. ABKÜRZUNGEN	5
3. EINLEITUNG	7
3.1 Zweck und Zielsetzung des Projekts	7
3.2 Bedeutung des Projekts für die Organisation	8
3.3 Umfang und Reichweite des Projekts	9
3.4 Organisation des Projekts	10
3.5 Zeitplan und Meilensteine	11
4. ANALYSE DER IST-SITUATION	13
4.1 Beschreibung der Ist-Situation	13
4.2 Identifizierung der Probleme	14
4.3 Ermittlung der Ursachen der Probleme	15
4.4 Festlegung der Ziele und Meilensteine	16
4.5 Beschreibung der Ist-Situation	17
4.6 Identifizierung der Probleme	18
4.7 Ermittlung der Ursachen der Probleme	19
4.8 Festlegung der Ziele und Meilensteine	20
4.9 Beschreibung der Ist-Situation	21
4.10 Identifizierung der Probleme	22
4.11 Ermittlung der Ursachen der Probleme	23
4.12 Festlegung der Ziele und Meilensteine	24
4.13 Beschreibung der Ist-Situation	25
4.14 Identifizierung der Probleme	26
4.15 Ermittlung der Ursachen der Probleme	27
4.16 Festlegung der Ziele und Meilensteine	28
4.17 Beschreibung der Ist-Situation	29
4.18 Identifizierung der Probleme	30
4.19 Ermittlung der Ursachen der Probleme	31
4.20 Festlegung der Ziele und Meilensteine	32
4.21 Beschreibung der Ist-Situation	33
4.22 Identifizierung der Probleme	34
4.23 Ermittlung der Ursachen der Probleme	35
4.24 Festlegung der Ziele und Meilensteine	36
4.25 Beschreibung der Ist-Situation	37
4.26 Identifizierung der Probleme	38
4.27 Ermittlung der Ursachen der Probleme	39
4.28 Festlegung der Ziele und Meilensteine	40
4.29 Beschreibung der Ist-Situation	41
4.30 Identifizierung der Probleme	42
4.31 Ermittlung der Ursachen der Probleme	43
4.32 Festlegung der Ziele und Meilensteine	44
4.33 Beschreibung der Ist-Situation	45
4.34 Identifizierung der Probleme	46
4.35 Ermittlung der Ursachen der Probleme	47
4.36 Festlegung der Ziele und Meilensteine	48
4.37 Beschreibung der Ist-Situation	49
4.38 Identifizierung der Probleme	50
4.39 Ermittlung der Ursachen der Probleme	51
4.40 Festlegung der Ziele und Meilensteine	52
4.41 Beschreibung der Ist-Situation	53
4.42 Identifizierung der Probleme	54
4.43 Ermittlung der Ursachen der Probleme	55
4.44 Festlegung der Ziele und Meilensteine	56
4.45 Beschreibung der Ist-Situation	57
4.46 Identifizierung der Probleme	58
4.47 Ermittlung der Ursachen der Probleme	59
4.48 Festlegung der Ziele und Meilensteine	60
4.49 Beschreibung der Ist-Situation	61
4.50 Identifizierung der Probleme	62
4.51 Ermittlung der Ursachen der Probleme	63
4.52 Festlegung der Ziele und Meilensteine	64
4.53 Beschreibung der Ist-Situation	65
4.54 Identifizierung der Probleme	66
4.55 Ermittlung der Ursachen der Probleme	67
4.56 Festlegung der Ziele und Meilensteine	68
4.57 Beschreibung der Ist-Situation	69
4.58 Identifizierung der Probleme	70
4.59 Ermittlung der Ursachen der Probleme	71
4.60 Festlegung der Ziele und Meilensteine	72
4.61 Beschreibung der Ist-Situation	73
4.62 Identifizierung der Probleme	74
4.63 Ermittlung der Ursachen der Probleme	75
4.64 Festlegung der Ziele und Meilensteine	76
4.65 Beschreibung der Ist-Situation	77
4.66 Identifizierung der Probleme	78
4.67 Ermittlung der Ursachen der Probleme	79
4.68 Festlegung der Ziele und Meilensteine	80
4.69 Beschreibung der Ist-Situation	81
4.70 Identifizierung der Probleme	82
4.71 Ermittlung der Ursachen der Probleme	83
4.72 Festlegung der Ziele und Meilensteine	84
4.73 Beschreibung der Ist-Situation	85
4.74 Identifizierung der Probleme	86
4.75 Ermittlung der Ursachen der Probleme	87
4.76 Festlegung der Ziele und Meilensteine	88
4.77 Beschreibung der Ist-Situation	89
4.78 Identifizierung der Probleme	90
4.79 Ermittlung der Ursachen der Probleme	91
4.80 Festlegung der Ziele und Meilensteine	92
4.81 Beschreibung der Ist-Situation	93
4.82 Identifizierung der Probleme	94
4.83 Ermittlung der Ursachen der Probleme	95
4.84 Festlegung der Ziele und Meilensteine	96
4.85 Beschreibung der Ist-Situation	97
4.86 Identifizierung der Probleme	98
4.87 Ermittlung der Ursachen der Probleme	99
4.88 Festlegung der Ziele und Meilensteine	100
4.89 Beschreibung der Ist-Situation	101
4.90 Identifizierung der Probleme	102
4.91 Ermittlung der Ursachen der Probleme	103
4.92 Festlegung der Ziele und Meilensteine	104
4.93 Beschreibung der Ist-Situation	105
4.94 Identifizierung der Probleme	106
4.95 Ermittlung der Ursachen der Probleme	107
4.96 Festlegung der Ziele und Meilensteine	108
4.97 Beschreibung der Ist-Situation	109
4.98 Identifizierung der Probleme	110
4.99 Ermittlung der Ursachen der Probleme	111
4.100 Festlegung der Ziele und Meilensteine	112

MEINEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	3
2.1 Grundlagen der Resistenz von Bakterien gegen- über Chemotherapeutika, insbesondere Antibiotika und Sulfonamiden	3
2.2 Bildung von Colicinen und deren Wirkung	13
2.3 Vorkommen von R- und Col-Faktoren und ihre Gemeinsamkeiten in bestimmten Eigenschaften	20
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	29
3.1 MATERIAL UND METHODEN	29
3.1.1 Herkunft der Stämme	29
3.1.2 Isolierung, Identifizierung und Konservierung der Stämme	33
3.1.3 Spezielle Verfahren zur Züchtung der E. coli aus Kot	35
3.1.4 Bestimmung der Unempfindlichkeit gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden	37
3.1.4.1 Anwendung des Agardiffusionsverfahrens	37
3.1.4.2 Durchführung des Reihenverdünnungstests	40
3.1.5 Bestimmung der Colicinogenie	41
3.2 ERGEBNISSE UND DAREN BESPRECHUNG	43
3.2.1 <u>E. coli-Stämme aus Sektionsmaterial</u>	43
3.2.1.1 Ergebnisse der Prüfung auf Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden	43
3.2.1.2 Ergebnisse der Prüfung auf Colicinogenie	48
3.2.1.3 Ergebnisse der Prüfung colicinogener Stämme im MHK-Test gegenüber Standardantibiotika	55
3.2.1.4 Gegenüberstellung von Einzelbefunden der arzneimittelresistenten, colicinogenen Stämme	63

3.2.2 <u>E. coli-Stämme aus der Faecalflora von</u> <u>Kälbern</u>	69
3.2.2.1 Ergebnisse der Prüfung auf Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden	72
3.2.2.2 Ergebnisse der Prüfung auf Colicinogenie	83
3.2.2.3 Einfluß des Verfahrens auf die Isolierung arzneimittelresistenter, colicinogener E. coli	92
3.2.2.4 Ergebnisse der Prüfung colicinogener Stämme im MHK-Test gegenüber Standard- antibiotika	98
3.2.2.5 Gegenüberstellung von Einzelbefunden der arzneimittelresistenten, colicinogenen Stämme	105
4. DISKUSSION	110
5. ZUSAMMENFASSUNG	119
6. LITERATURVERZEICHNIS	124
Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

Bakterien mit Resistenz gegenüber Arzneimitteln kommen heute weit verbreitet in der Natur vor. *E. coli* gilt als eine der Bakterienarten, welche gegenüber mehreren Chemotherapeutika gleichzeitig unempfindlich sein können. Diesen Tatbestand verdankt sie anscheinend ihrem Vorkommen als Erreger von Infektionskrankheiten sowie als obligates Darmbakterium bei Mensch und Tier. Dadurch war sie seit der Einführung von Antibiotika und Sulfonamiden in die Therapie von Infektionskrankheiten und zu nutritiven Zwecken innerhalb der Tierernährung am häufigsten gegenüber Chemotherapeutika exponiert, so daß ein hoher Prozentsatz unempfindlicher Keime in den Populationen dieser Species nicht verwunderlich ist. Da *E. coli* auch zu jenen Arten gehört, die antibiotische Stoffe gegen sich selbst und verwandte Species produzieren, könnten Keime, die diese Bacteriocine bilden und zugleich resistent gegenüber Chemotherapeutika sind, eine Gefahr für Mensch und Tier bedeuten. *E. coli*-Stämme, die mit den Eigenschaften Arzneimittelresistenz und Colicinogenie ausgestattet sind, dürften gegenüber ihren Artgenossen im Vorteil sein und diese allmählich aus den Populationen überhaupt verdrängen. Nach den heutigen Erkenntnissen der Genetik vererben solche Bakterien diese Eigenschaften nicht nur ihren Nachkommen. Die Merkmale können wechselseitig auch anregen, daß noch andere artgleiche oder nur artverwandte Bakterien damit "angesteckt" werden. So wie *E. coli*-Stämme die Eigenschaften von Arzneimittelresistenz und Colicinogenie hinzugewinnen, können sie sie allerdings auch wieder verlieren. Daraus ergab sich die Fragestellung dieser Arbeit.

Nach nunmehr etwa drei Jahrzehnten langer Anwendung von Antibiotika und Sulfonamiden in der Human- und Veterinärmedizin sowie in der Tierernährung, sollte einmal untersucht werden, wie häufig arzneimittel-resistente E. coli-Stämme, die gleichzeitig über colicinogene Eigenschaften verfügen, bei Tieren anzutreffen sind. Es wurde dabei für zweckmäßig gehalten, nicht nur als Krankheitserreger aufgetretene E. coli-Stämme hinsichtlich dieser Merkmale zu prüfen, sondern auch Stämme aus der Faecalflora von Tieren daraufhin zu testen, um gegebenenfalls aufzeigen zu können, daß Unterschiede im Vorkommen solcher Stämme bestehen. Da die Kenntnisse über die Bildung der heute bekannten, sich in der Wirkung und den Eigenschaften teilweise voneinander unterscheidenden Colicine durch E. coli-Stämme von Tieren noch recht lückenhaft sind, wurde Wert darauf gelegt, bei der Bestimmung der Colicinogenie auch die einzelnen Colicintypen mit zu erfassen.

2. SCHRIFTTUM

2.1 Grundlagen der Resistenz von Bakterien gegenüber Chemotherapeutika, insbesondere Antibiotika und Sulfonamiden

Das Auftreten einer Chemoresistenz bei Mikroorganismen ist ebenso lange bekannt wie die Chemotherapie (EHRlich, 1907; GILLESSEN u. GILLESSEN, 1960). Mit der breiten Anwendung der Antibiotika nahmen die Resistenzerscheinungen bei Bakterien zu (MAC LEAN et al., 1939; ABRAHAM et al., 1941). Das war bedrückend für diejenigen, die die Antibiotika als "Wunderdroge" ansahen, gab aber den Genetikern eine einmalige Möglichkeit des Studiums eines evolutionären Vorgangs (RICHMOND, 1969).

Die bakterielle Resistenz wird heute definiert als relativer, dosisabhängiger Begriff, über den nur in Beziehung zu einem antibakteriellen Wirkstoff Aussagen gemacht werden können (WALTER u. HEILMEYER, 1969). Parameter dafür sind Wirkungsintensität eines Stoffes in vitro, ausgedrückt in der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK), sowie die von ihm am Wirkungsort in vivo erreichbare Konzentration. Liegt die minimale Hemmkonzentration eines Keimes in vitro höher als die in vivo messbaren Werte von Serum oder Gewebe, so gilt nach WALTER u. HEILMEYER (1969) der Keim als resistent. CHABBERT (1963) schlägt eine andere Definition vor, nämlich, ein Stamm ist resistent, wenn er eine bemerkenswert höhere Antibiotikakonzentration verträgt als die Menge, die zur Unterdrückung des Wachstums der Mehrheit der anderen Stämme der gleichen Spezies oder von Individuen der gleichen Kultur erforderlich ist.

Die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika verdanken Mikroorganismen im wesentlichen drei Arten von Merkmals-

bildung (BRYSON u. SZYBALSKI, 1955; LEPPER, 1955; GILLESSEN u. GILLESSEN, 1960; WALTER u. HEILMEYER, 1969; ANDERSON, 1969 u. 1970; u.a.).

Die natürliche Resistenz ist eine genetisch fixierte Rassen- oder Spezieseseigenschaft, die sich in einer angeborenen Widerstandsfähigkeit gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen äußert. Sie kann ein Merkmal einer Species, Rasse, Familie oder auch eines Individuums sein (RIECK, 1971). Auf sie ist es zurückzuführen, daß das Wirtsspektrum eines Antibiotikums beispielsweise eine bestimmte Bakterienart nicht umfaßt (RITZERFELD, 1974). Dadurch sind Bakterien einheitlich resistent gegenüber antimycetisch wirksamen Antibiotika und umgekehrt, Pilze sprechen nicht auf Stoffe mit antibakterieller Wirkung an (WALTER u. HEILMEYER, 1969).

Die "erworbene", primäre oder sekundäre Resistenz beruht dagegen auf mutativen Veränderungen der Nukleotidsequenz der chromosomalen Desoxyribonukleinsäure (DNS) einzelner Keime einer Spezies, die normalerweise gegenüber einem Chemotherapeutikum empfindlich sind (WALTER u. HEILMEYER, 1969). Diese sowie die angeborene Resistenz wird auch als genotypische Resistenz bezeichnet (BRUNNER, 1972). Unter primärer Resistenz wird das Auftreten resistenter Varianten innerhalb einer sensiblen Kultur, ohne daß diese vorher Kontakt mit dem Antibiotikum gehabt hatte, verstanden (BRYSON u. SZYBALSKI, 1955). Als sekundär resistente Mikroorganismen sind jene Keime anzusprechen, die erst während des Kontaktes mit einem Antibiotikum eine verminderte oder fehlende Empfindlichkeit entwickeln.

Beide Formen sind nicht als eine direkte Abwehrreaktion der Mikroorganismen zu verstehen. Sie kommen auch nur mit einer natürlichen Mutationsrate von 10^{-6} bis 10^{-13} Keimen vor (BRESCH, 1970). Von dem Antibiotikum geht dabei lediglich eine selektive Wirkung aus (BRYSON u.

SZYBALSKI, 1955; DEMEREC, 1955 u. 1957; SCHNITZER u. GRUNBERG, 1957; GILLESSEN u. GILLESSEN, 1960; POLLOCK, 1960; MOYED, 1964; BRESCH, 1970; u.a.), wodurch die resistenten Keime und deren Nachkommen überleben können und eine resistente Population entstehen kann. Da derartig mutierte Zellen vielfach in lebenswichtigen Eigenschaften anderen Keimen gegenüber unterlegen sind, verschwinden sie jedoch meist wieder, wenn das Antibiotikum abgesetzt wird (GEDEK, B., 1973). Außerdem sind im allgemeinen die Antibiotika-Resistenzgene rezessiv gegenüber den sensiblen Allelen (LEDERBERG, 1951; ZELLE u. LEDERBERG, 1951).

Die sekundäre Resistenz, die in ihrer Entwicklung *in vitro* genau verfolgt werden kann, läßt sich in zwei, vom Wirkungsmechanismus des Chemotherapeutikums abhängige, Resistenz-Entwicklungstypen einteilen (DEMEREC, 1955 u. 1957):

1. Die one-step-mutation bedeutet, ein Resistenzanstieg kann schon in wenigen Schritten (im günstigsten Fall schon nach einer Passage) erfolgen (Abb. 1). Die Mutanten zeichnen sich dabei unabhängig von der verwendeten Konzentration des Chemotherapeutikums durch einen sehr hohen Grad von Resistenz aus.

2. Bei der multiple-step-mutation sind mehrere aufeinanderfolgende Mutationsschritte zur Ausprägung einer Resistenz erforderlich (Abb. 1). Das Erreichen von hohen Resistenzgraden ist abhängig von der Chemotherapeutikakonzentration, gegenüber welcher die Keime exponiert wurden.

Mit dem Fluktuationstest von LURIA u. DELBRÜCK (1943) kann das spontane Auftreten resistenter Varianten nachgewiesen werden, mit Hilfe der Replika-Technik von LEDERBERG u. LEDERBERG (1952) dagegen ist der Nachweis zuvor bereits vorhandener resistenter Varianten innerhalb einer Population möglich.

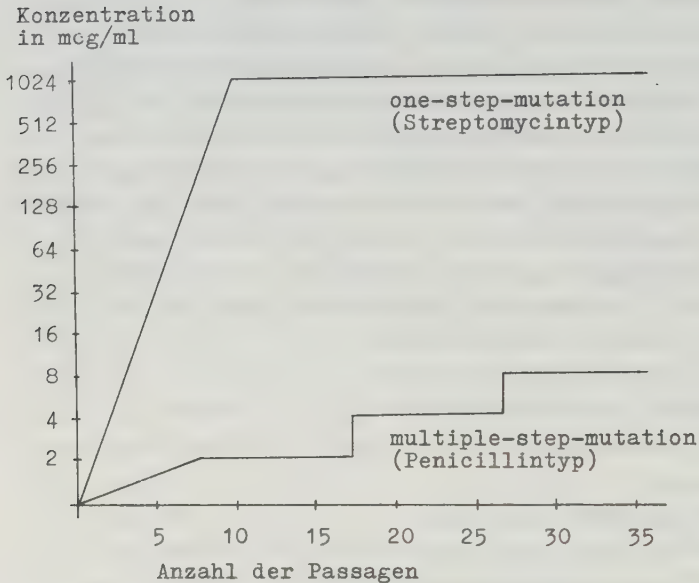


Abb. 1: Resistenzanstieg nach dem multiple-step-mutation-Typ und nach dem one-step-mutation-Typ (nach WALTER u. HEILMEYER, 1969)

Durch die mutativen Veränderungen des Bakterienchromosoms kommt es in der Regel nur zur Monoresistenz, ausgelöst durch Permeabilitätsänderungen oder Veränderung in den ribosomalen Elementen der Zelle. Dabei hindert entweder das Targetmolekül den Stoff an seiner wachstumshemmenden oder keimabtötenden Wirkung oder das Antibiotikum wird nach seinem Eindringen enzymatisch inaktiviert, wenn es nicht sogar aktiv aus der Zelle eliminiert wird (BRUNNER, 1972; GEDEK, B., 1973). Eine andere Art von Resistenz beruht auf der Übertragung von chromosomalem oder extrachromosomalem genetischem Material von einer Bakterienzelle auf eine andere. Dafür sind im wesentlichen drei Mechanismen, die Transformation, die Transduktion und die Konjugation

bekannt, welche BRESCH (1970) als parasexuelle Prozesse bezeichnet.

Bei der Transformation wird ein Teilstück eines Bakteriengenoms ohne Vermittlung eines Phagen von einem Donor auf einen Rezipienten übertragen, und die nackte DNS in das Genom der Rezipientenzelle eingebaut. Da es sich nur um DNS-Fragmente eines Bakteriengenoms handelt, erlangt die Zelle damit meist nur die Eigenschaft der Resistenz gegenüber einem Stoff. Außerdem ist die Übertragungsfrequenz selbst bei kompetentem Zustand des Rezipienten sehr gering (GÜNTHER, 1969). Dieser Vorgang spielt vor allem beim Erwerb einer Streptomycin-Resistenz durch Streptokokken und Pneumokokken oder bei Neisseria gonorrhoeae sowie Haemophilus-Stämmen eine Rolle (BRANDIS, 1965; RICHMOND, 1969; BRESCH, 1970).

Bei der Transduktion handelt es sich um eine Übertragung von Bakteriengenomen durch Phagen (ZINDER u. LEDERBERG, 1952). Die DNS virulenter Phagen steuert nach der Induktion der Bakterienzelle sofort die Neusynthese von Phagen. Dabei wird neben der Phagen-DNS auch Bakterien-DNS in die Phagenhülle aufgenommen und kann so bei einer erneuten Infektion weitergegeben werden (LEBEK, 1969). Bei temperierten Phagen verbleibt die DNS nach der Infektion als Prophage im Bakterium und wird ins Chromosom der Wirtszelle eingebaut. Das nunmehr lysogene Bakterium vermehrt sich und repliziert mit dem Bakteriengenom auch die Phagen-DNS. Spontan oder nach Induktion, kann sich der Prophage aus dem Bakteriengenom lösen, sich vermehren und die Wirtszelle lysieren. Auch hier werden im Verlauf der Phagensynthese kleine Teile des Bakterienchromosoms in die Phagen eingebaut.

Als Resistenz-Übertragungsmechanismus hat die Transduktion anscheinend nur geringe Bedeutung. So wird auch hierbei meist nur eine chromosomal gesteuerte

Resistenzeigenschaft übertragen (JINKS, 1967; LEBEK, 1969; SWANSON et al., 1970). Es ist dies darauf zurückzuführen, daß die einzelnen Antibiotikaresistenzen in der Regel im Bakterienchromosom nicht hintereinander lokalisiert vorliegen. Die Häufigkeit der Übertragung eines Chromosomensegments beträgt etwa 10^{-5} bis 10^{-7} (BRESCH, 1970). Die Übertragung von Arzneimittelresistenz auf dem Weg der Transduktion kommt vor allem bei Staphylokokken (NOVICK u. MORSE, 1967; NOVICK u. RICHMOND, 1965), aber auch bei Enterobakterien vor. Eine Resistenz gegenüber Tetracyclinen, Streptomycinen und Makrolid-Antibiotika und sogar die Fähigkeit zur Penicillinase-Bildung kann auf diese Weise von einem Bakterium erworben werden (BRANDIS, 1965; WALTER u. HEILMEYER, 1969).

Bei der dritten Form, der Konjugation gelangt im Gegensatz zur Transduktion und Transformation, wobei nur kurze Segmente genetischen Materials (meist nur ein einzelnes Resistenzgen) übertragen werden, mehr Genmaterial, also in der Regel mehr als ein Resistenzgen von einer Donorzelle über die Plasmabrücken in eine Rezipientenzelle (WATANABE, 1971). Die Konjugation ist allerdings nur möglich bei gleichzeitigem Vorhandensein eines Fertilitätsfaktors (F-Faktor) in der Donorzelle (WATANABE u. FUKASAWA, 1960); die Zelle wird dann als F^+ bezeichnet. Der Fertilitätsfaktor ist ein kleines ringförmiges Chromosomensegment, der als unabhängige Einheit extrachromosomal oder auch integriert im Bakterienchromosom vorliegen kann. Ist der F-Faktor im Genom enthalten, so werden solche Zellen wegen der besonders hohen Konjugationsfrequenz als Hfr (high frequency of recombination)-Zellen angesprochen (WATANABE u. FUKASAWA, 1960).

Der Fertilitätsfaktor F produziert einen speziellen Pilus, der den Kontakt zur Rezeptorzelle herstellt. Er besorgt dann auch den Transfer des genetischen Materials (JACOB u. WOLLMANN, 1961; BRINTON et al., 1964).

Bei der Konjugation werden zusammen mit dem F-Faktor Mehrfachresistenzen von F^+ auf F^- -Zellen übertragen. Sie kommt vor allem bei Darmbakterien (HARADA et al., 1960) und bei *Serratia* (ROWND et al., 1966) sowie *Vibrio* spp. (BARON u. FALKOW, 1961) vor.

In den Jahren 1958 bis 1960 wurde infolge der plötzlichen Veränderung der epidemiologischen Situation in Japan schließlich noch jener Mechanismus der bakteriellen Antibiotikaresistenz bekannt, welcher in der Literatur unter den Begriffen episomale Resistenzübertragung oder "infektiöse Resistenz" (JACOB u. WOLLMANN, 1961; HAYES, 1964; LEBEK, 1969; BRESCH, 1970; u.a.) geführt wird. Sie wird durch ein extrachromosomales Genelement, den Resistenzfaktor (R-Faktor), ausgelöst (AKIBA, 1960; OCHAI, 1962). Dieser besteht nach WATANABE u. FUKASAWA (1960) aus einer Übertragungseinheit (RTF, resistance transfer factor), die die Ausbildung der speziellen Pili herbeiführt, und aus verschiedenen Resistenzdeterminanten (RD), in denen die Resistenzeigenschaften gegenüber einzelnen Antibiotika festgelegt sind.

Episome, wie der RTF- oder F-Faktor (s.o.) sind genetische Elemente, die in zwei alternierenden Phasen frei im Zytoplasma oder ins Chromosom integriert vorkommen können (JACOB u. WOLLMANN, 1958; CAMPBELL, 1969). Ein dem Episom verwandtes Element ist das Plasmid, das sich im Zytoplasma autonom reproduziert und vom Chromosom unabhängig ist (BRANDIS u. SMARDA, 1971). Jedoch können diese beiden Begriffe nicht immer streng getrennt werden (LEBEK, 1969; BRANDIS u. SMARDA, 1971). Die Resistenzplasmide sind vom Chromosom unabhängige Gengruppen, welche die Zellen von außen gewonnen haben. Diese Tatsache bedeutet für die Zellen plötzlichen Erwerb von neuen Eigenschaften, zu denen sie sonst nur zufällig durch eine Mutation kommen würden. Die Resistenzplasmide stellen für die Zelle im antibiotika-

freien Milieu keinen lebenswichtigen Faktor dar. Sie ermöglichen ihr aber in Anwesenheit von Antibiotika zu überleben. Aufnahme und Verlust von R-Faktoren haben keinen Einfluß auf die Vitalität der Zelle (KRCMERY u. KETTNER, 1970).

Nach THIELE (1970) werden R-Faktoren eher durch weniger virulente Rauh-Formen von Bakterien aufgenommen, seltener aber auch von virulenten, weichen Bakterienzellen akzeptiert. Eine Reduzierung der Virulenz wurde vor allem bei der Übertragung von R-Faktoren auf *Salmonella typhimurium* (THIELE, 1970; SMITH, 1972) bzw. *Salmonella choleraesuis* (JAROLMEN u. KEMP, 1969) gefunden. WATANABE (1972) konnte allerdings eine signifikant reduzierte Virulenz bei *Salmonella typhimurium* nach R-Faktor-Übertragung nicht feststellen.

Auch klinische und epidemiologische Daten zeigen, daß R-Faktor-tragende und sensible Bakterien gleich virulent sind (WIEDEMANN, 1972). R-Faktor-tragende Rauh-Mutanten können auch unter natürlichen Bedingungen häufiger vorkommen als R-Faktor-tragende S-Formen, wahrscheinlich werden sie aber eher durch die Abwehrmechanismen des Organismus zerstört (WATANABE, 1972).

Virulente R-Faktoren produzieren Repressoren gegen die eigenen Gene (Autorepression, KRCMERY u. KETTNER, 1970). Die Übertragung von virulenten R-Faktoren ist daher minimal. R-Faktoren werden nur von einigen de-reprimierten Mutanten übertragen (MEYNELL u. DATTA, 1968). Hat jedoch eine Zelle gerade erst einen R-Faktor erhalten, bleibt die Bildung des Repressors für etwa fünf Generationen aus. Es bildet sich ein HFRT-System (high frequency resistance transfer, WATANABE, 1963a), nun erfolgt die explosive Ausbreitung von R-Faktoren durch Konjugation zwischen den Empfängerkeimen, so daß nach kurzer Zeit die ganze Population des Empfängerstammes R^+ wird.

Zwischen R-Faktoren und anderen Episomen bestehen Wechselwirkungen (HAMON u. CHABBERT, 1970; MORRISON u. MALAMY, 1970; BRANDIS u. SMARDA, 1971; ZEUTHEN u. PATHO, 1971; u.a.). R-Faktoren, die die Funktion des F-Faktors unterdrücken, bezeichnet man als fi^+ , diejenigen, die keinen Einfluß auf den Fertilitätsfaktor haben als fi^- (WATANABE et al., 1964). fi^+ R-Faktoren können in einem Hfr-Stamm die Lyse durch sex-spezifische Phagen unterdrücken. Dies wurde zur Unterscheidung der beiden R-Faktor-Typen benutzt (CHABBERT et al., 1972). Bei E. coli-Stämmen sind fi^+ R-Faktoren stabil, bei der Übertragung auf Salmonellen verlieren sie ihre Resistenzdeterminanten mit hoher Frequenz. Dagegen sind fi^- R-Faktoren stabil bei beiden Spezies (WATANABE u. OGATA, 1970).

Bakterien, die übertragbare R-Faktoren haben, produzieren R-pili. Nach morphologischen Studien wird angenommen, daß die fi^+ R-Faktoren Pili produzieren, die den F-pili ähnlich sind, während die fi^- R-Faktoren den I-pili ähnliche synthetisieren; I-pili werden vom Col I-Faktor produziert. Deshalb werden die fi^+ R-Faktoren "F-like (F-ähnlich)" oder "R (f)", und die fi^- R-Faktoren "I-like (I-ähnlich)" oder "R (i)" genannt (MEYNELL et al., 1968; NOVICK, 1969). Allerdings wurden auch einige fi^+ R-Faktoren entdeckt, die die Synthese von I-like R-Faktoren steuern, weshalb diese Eigenschaft nicht unbeschränkt zur Erkennung und Klassifizierung von R-Faktoren verwendet werden kann.

Unabhängig davon wurde von WATANABE et al. (1964) beobachtet, daß zwei Plasmide vom selben Fertilitätstyp nicht stabil in einer Zelle koexistieren können. Dieses Phänomen wurde "Inkompatibilität" genannt. Sie kann leicht bei R-Faktoren beobachtet werden, und dient der Klassifizierung der R-Faktoren (DATTA u. HEDGES, 1971; HEDGES u. DATTA, 1971). Mitglieder der gleichen Kompatibilitätsgruppe sind unverträglich untereinander,

können aber mit Plasmiden anderer Gruppen stabil ko-existieren (ROMERO, 1970; DATTA u. HEDGES, 1971; HEDGES u. DATTA, 1971; COETZEE et al., 1972; CHABBERT et al., 1972; KHATOON et al., 1972; SMITH et al., 1973). Im allgemeinen sind R-Faktoren einer Gruppe gleich groß (GRINDLEY et al., 1972).

Die durch R-Faktoren bedingte Resistenz wird hauptsächlich durch die Bildung spezifischer, die Antibiotika inaktivierenden Enzyme verursacht (SHAW, 1966; ANDERSON, 1967; KRCMERY u. JANOUSKOVA, 1969b; ACHTMANN et al., 1971; BENVENISTER u. DAVIS, 1971; u.a.).

R-Faktoren können auf alle Gene von Enterobacteriaceae innerhalb der Spezies oder auch zwischen den Spezies übertragen werden (MITSUHASHI et al., 1960; WATANABE, 1963b; LEBEK, 1963; LEBEK u. SCHMIEDEL, 1964; WIEDEMANN et al., 1969). Außerdem ist eine Übertragung möglich auf *Vibrio cholerae* (BARON u. FALKOW, 1961; KUWAHARA et al., 1963), sowie Arten der Gattungen *Pasteurella*, *Yersinia* (GINOZA u. MATNEY, 1963) und *Aeromonas* (AOKI et al., 1971). Übertragungsversuche auf grampositive Bakterien waren bis jetzt nicht erfolgreich (WATANABE, 1971).

Auf die R-Faktor-Übertragung soll die hohe Zahl mehrfachresistenter Enterobacteriaceae zurückzuführen sein (LEBEK u. SCHMIEDEL, 1964). R-Faktoren mit Resistenzdeterminanten sind für folgende Chemotherapeutika bis jetzt bekannt: Streptomycin, Tetracycline, Chloramphenicol, Sulfonamide, Kanamycin/Neomycin, Gentamycin, Spectinomycin, Cephalosporine und Penicilline, ferner Furazolidon, Nalidixinsäure und Trimethoprim (LEBEK, 1963 u. 1969; WATANABE, 1963b; WATANABE u. SATO, 1964; DATTA u. KONTOMICALOU, 1965; ANDERSON u. DATTA, 1965; MITSUHASHI et al., 1965; CHABBERT u. LE MINOR, 1966; SMITH, 1967; u.a.). Bislang noch nicht nachgewiesen wurden R-Faktoren gegenüber Nitrofurantoin, Rifampizin und den Polymyxinen (KRCMERY u. KETTNER, 1970).

2.2 Bildung von Colicinen und deren Wirkung

Der belgische Forscher André GRATIA beschrieb im Jahre 1925 einen Sonderfall von Antagonismus zwischen zwei *E. coli*-Stämmen. Das Filtrat der Bouillonkultur des einen (V = virulent), hemmte wesentlich die Vermehrung des einen Stammes der gleichen Art, der als sensibel gegenüber bestimmten Bakteriophagen bekannt war. Er erkannte jedoch, daß nicht Bakteriophagen, sondern ein anderes antibiotisches Agens die Ursache war. Das beobachtete Phänomen bezeichnete er als "Prinzip V".

Diese Mitteilung geriet weitgehend in Vergessenheit, bis im Jahre 1946 GRATIA's Schüler Pierre FREDERICQ die genaue Untersuchung dieses besonderen Falles von Antagonismus zwischen zwei Bakterienstämmen wieder aufnahm. Er entdeckte, daß diese Substanzen auch bei anderen *Escherichia coli*-Stämmen keine Seltenheit sind und bezeichnete sie als "Colicine" (GRATIA u. FREDERICQ, 1946).

Nach Bekanntwerden weiterer, den Colicinen analoger Substanzen auch bei anderen Bakterienarten, schlugen JACOB et al. (1966) für diese antibiotischen Substanzen den Begriff "Bacteriocine" vor und definierten ihn folgendermaßen: "Das Bacteriocin ist ein Antibiotikum von Eiweißcharakter, dessen Produktion letal ist und dessen Wirkung, begrenzt auf einen engen Komplex verwandter Arten, durch die Gegenwart spezifischer Rezeptoren bedingt ist". Bakterien, die Bacteriocine bilden, werden als bacteriocinogen bezeichnet. Die Colicine lassen sich definieren als Bacteriocine von *Escherichia coli* (BRANDIS u. SMARDA, 1971). Inzwischen wurden Bacteriocine und bacteriocinähnliche Substanzen auch noch bei fast allen anderen gramnegativen Bakterienarten und desgleichen bei einigen grampositiven Arten festgestellt (s.Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht über die Bakterienarten, bei denen Bacteriocine bzw. bacteriocinähnliche Substanzen nachgewiesen worden sind (BRANDIS u. SMARDA, 1971)

a) gramnegative Bakterien		
Familie	Art	Bezeichnung der antibiotischen Substanz
Pseudomonadaceae	Pseudomonas aeruginosa Ps. fluorescens Ps. phytopathogenes Xanthomonas spp.	Pyocin Fluocin
Spirillaceae	Vibrio cholerae	Vibriocin
Rhizobiaceae	Agrobacterium tumefaciens	
Achromobacteriaceae	Achromobacter spp. Alcaligenes faecalis	
Enterobacteriaceae	Escherichia coli Citrobacter freundii Shigella spp. Salmonella spp. (einschl. Arizona) Klebsiella pneumoniae Enterobacter (Aerobacter) aerogenes E. cloacae Hafnia alvei Serratia marcescens Proteus mirabilis Proteus morganii Proteus vulgaris Erwinia carotovora	Colicin Aerocin Marcescin
Parvobacteriaceae (Brucellaceae)	Pasteurella pestis P. pseudotuberculosis Pasteurella multocida P. tularensis Brucella spp. Bordetella pertussis	Pesticin
Bacteroidaceae	Bacteroides spp.	
Myxococcaceae	Chondrococcus columnaris	
Neisseriaceae	Neisseria meningitidis	

Fortsetzung von Tabelle 1

b) grampositive Bakterien

Familie	Art	Bezeichnung der antibiotischen Substanz
Micrococcaceae	Staphylococcus aureus Staphylococcus albus Micrococcus spp.	Staphylococcin
Lactobacillaceae	Streptococcus pyogenes Diplococcus pneumoniae Str. viridans Str. faecalis Str. faecium Str. lactis Lactobacillus spp.	Enterocin
Corynebacteriaceae	Listeria monocytogenes Corynebacterium diphtheriae	Monocin
Bacillaceae	Bacillus megaterium B. cereus B. subtilis Clostridium perfringens Cl. botulinum Cl. sporogenes	Megacin Cerecin Welchicin Boticin
Mycobacteriaceae	Mycobacterium tuberculosis	
Streptomycetaceae	Streptomyces virginiae	

Da weitere Untersuchungen die Frage des Proteincharakters der Colicine und ihrer Rezeptoren mittlerweile geklärt haben, erachtet SMARDA (1971) nunmehr folgende Definitionen für die Colicine als zutreffender:

"Colicine sind spezifisch antibiotische, im Lauf des Wachstums bestimmter Kulturen von Enterobacteriaceae, insbesondere *Escherichia coli*, gebildete Stoffe, deren wirksamer Bestandteil Protein- (Polypeptid-) Charakter hat, die ein spezifisches Stammwirkungsspektrum aufweisen, begrenzt auf andere Stämme der eigenen Art und eventuell verwandter Arten, immer jedoch auf *Escherichia coli* wirksam sind, und die zu ihrer Wirkung einen spezifischen Rezeptor in der zytoplasmatischen Membran der sensiblen Zelle benötigen".

Die Fähigkeit Colicine zu erzeugen, ist eine sehr stabile erbliche Eigenschaft bei bestimmten Enterobacteriaceae-Stämmen, und muß deshalb durch genetische Determinanten gesteuert werden, die colicinogene Faktoren oder Col-Faktoren genannt werden (FREDERICQ u. DELHALLE, 1972a). Der Col-Faktor ist ein DNS-Segment (LAVALLE u. JACOB, 1961), das sich elektronenoptisch als zirkuläres (nur zu 10-20 % offenes), zweisträngiges, teilweise verdrehtes Molekül darstellt, mit einer Länge von 2,3 μ (Col E₁) bis 32,0 μ (Col Ib) und einem Molekulargewicht von 4,5 oder 9,2 x 10⁶ (ROTH u. HELINSKI, 1967).

Die Col-Faktoren werden durch Konjugation und Transduktion übertragen, wobei der Rezipient immer ein identisches Colicin produziert wie der Donor-Stamm und seinerseits den Col-Faktor auf andere Stämme weiter übertragen kann. Der neue colicinogene Stamm unterscheidet sich vom ursprünglichen nicht colicinogenen durch nichts anderes als gerade dadurch, daß er colicinogen ist (SMARDA, 1971).

Colicinogene Faktoren lassen sich durch Konjugation nicht nur auf *Escherichia coli*, sondern auch auf *Shigella*-, *Klebsiella*-, *Salmonella*-, *Providencia*-,

Proteus- und Serratia-Stämme übertragen (FREDERICQ, 1954, 1958, 1959).

SMARDA (1971) gibt 23 unterschiedliche Typen von Colicinen an und stellt folgende allgemeine Theorie der Colicinwirkung auf:

1. Jedes Colicin wirkt nur auf bestimmte Stämme. Der gleiche Stamm kann aber gelegentlich gegenüber mehreren Colicinen sensibel sein.
2. Die bakteriostatische Wirkung der Colicine nach dem Kontakt ist augenblicklich, sie ist aber eine bestimmte Zeit lang durch Trypsin oder ein Anticolicin-Serum reversibel. Die Adsorption selbst ist jedoch offenbar irreversibel.
3. Die Colicine dringen also nicht in die Zelle ein, sondern verfangen sich irgendwo auf ihrer Oberfläche und wirken von dort aus.
4. An die gleiche Stelle der Bakterienoberfläche (sog. Rezeptor) können Colicine mit verschiedener Wirkung gebunden werden, während unterschiedliche Colicine, die sich an verschiedene Rezeptoren binden, im wesentlichen die gleiche Primärwirkung auf die Zelle haben können.
5. Zur Adsorption des Colicins ist keine Energiezufuhr von Seiten der Zelle erforderlich, sie ist aber notwendig zur Entwicklung seines biochemischen Effektes.
6. Die Sensibilität der Sphäroblasten und der stabilen L-Form der sensiblen Zellen gegenüber Colicinen gleicht der der normalen Stäbchen desselben Stammes, oder sie ist höher (ausnahmsweise niedriger).
7. Die letale Wirkung der meisten Colicine verläuft nach der Eintrefferkurve.
8. Die Rate und der Grad der Wirkung der Colicine sind eine Funktion der "Multiplizität" der Letaleinheit auf die Zelle.

9. Der eigene Primäreffekt der verschiedenen Colicine auf die Biochemie der Zelle ist verschieden.
10. Das Colicin E₂ bewirkt in den Zellen die Degradation der DNS, bei direkter Berührung mit DNS in vitro hat es jedoch keine DNase analoge Wirkung.
11. Colicinogene Bakterien, die gegenüber dem homologen Colicin immun sind, adsorbieren es trotzdem, während die gegenüber bestimmten Colicinen resistenten Bakterien es nicht adsorbieren. Es gibt aber auch refraktäre Mutanten, die der Wirkung eines bestimmten Colicins nicht unterliegen, obwohl sie es adsorbieren und den entsprechenden Col-Faktor nicht enthalten.

Die verschiedenen Colicintypen weisen nicht nur Unterschiede in der chemischen Struktur auf, sondern sie differieren auch hinsichtlich ihres Wirtsspektrums sowie ihrer Empfindlichkeit gegenüber Proteasen. Sie werden mit Buchstaben des Alphabets bezeichnet. Alle 23 Typen sollen bei *E. coli* vorkommen, während nur manche auch durch die Stämme der anderen Bakteriengattungen der Familie Enterobacteriaceae gebildet werden (BRANDIS u. SMARDA, 1971).

Einige dieser Col-Faktoren wirken wie der F-Faktor, d.h. sie verfügen damit über einen Fertilitätsfaktor, mit dessen Hilfe sie die Konjugation herbeiführen und selbst übertragen werden können. Man unterscheidet demgemäß selbstübertragbare und nicht selbstübertragbare Col-Faktoren (KRCMERY et al., 1970). Als selbstübertragbar gelten V, B und I, während die ganze Gruppe E sowie K und X nicht selbstübertragbar sind (NOVICK, 1969). Auch bei den Col-Faktoren gibt es solche, die die Funktion des F-Faktors unterdrücken (fi^+), und solche, die keine Beziehung zum F-Faktor haben (fi^-) (MEYNELL et al., 1968).

Die Produktion des Colicins erfolgt nicht laufend, sondern nur nach Induktion einer Zelle. Dies kann spontan

oder auf einen Einfluß von außen hin erfolgen und führt dann zu Massenproduktion des Colicins und meist zum Tod der induzierten Zelle. Eine Zelle "opfert sich" also und tötet für andere Zellen ihres Klons alle nicht zum Klon gehörenden *E. coli*-Zellen ab (REEVES, 1965).

2.3 Vorkommen von R- und Col-Faktoren und ihre Gemeinsamkeiten in bestimmten Eigenschaften

In der Natur vorkommende R-Faktor-tragende Stämme sind häufig colicinogen (IVANOVICS, 1962; HOLLAND, 1967). Die Häufigkeit des Vorkommens von R-Faktoren bei antibiotikaresistenten *E. coli*-Stämmen geht aus einer tabellarischen Übersicht (s.Tab. 2) hervor, bei deren Zusammenstellung vor allem Autoren Berücksichtigung fanden, deren Untersuchungen noch nicht lange zurückliegen.

Dem Vorkommen der Colicinogenie bei *Escherichia coli* wurden schon eine ganze Reihe von Arbeiten gewidmet (GRATIA u. FREDERICQ, 1946; GARDENER, 1950; PAPA VASSILIOU, 1960; CLOWES, 1963; HAMON u. PERON, 1965). Im allgemeinen wird die Frequenz der Colicinbildung mit 20-25 % angenommen (BRANDIS u. SMARDA, 1971). Bei den von Tieren isolierten Stämmen schwanken jedoch die Angaben der verschiedenen Autoren sehr. PAPA VASSILIOU (1960) fand bei 13 % (von 83 *E. coli*-Stämmen) Colicinogenie, VASENIUS (1966) bei 559 ferkelpathogenen *E. coli*-Stämmen 60 %, hingegen bei 354 nichtpathogenen nur 17 % colicinogene Stämme. NOVAKOVA et al (1969) untersuchten 301 Tetracyclin-resistente Stämme von Schweinen, davon waren 31 % colicinogen. Von den enteropathogenen Stämmen waren es sogar 37 %. STROKOV (1971) isolierte 28 % colicinogene *E. coli*. KRCMERY u. WIEDEMANN (1972) untersuchten 109 R-Faktor-tragende Stämme, davon produzierten 43 Colicine. HORAK u. LANC (1973) fanden bei 175 *E. coli*-Stämmen von Patienten, die an Harnwegsinfektion erkrankt waren 45 % colicinogene, wobei am meisten Col V (19 %) gebildet wurden. JAKOVINA (1972) isolierte bei 89 % der Stämme von gesunden Hühnern und bei 80 % der Stämme von Hühnern mit Enteritis Colicine. ALWIS u. THOMLINSON (1973) fanden unter kommensalen *E. coli*-Stämmen 44 % colicinogene, aber nur einen

enteropathogenen Stamm. HETTIARATCHY et al. (1973) wies bei Rindern 31 %, bei Schweinen 40 %, bei Hühnern 71 % Colicinogenie nach. Bei Patienten, die weniger als 20 Tage im Krankenhaus stationiert waren, zeigten 69,4 %, bei solchen die länger als 20 Tage dort untergebracht waren nur 42,3 % der Stämme colicinogene Eigenschaften.

TOMESCU u. DECUN (1972) isolierten aus Trinkwasser und Abwasser von Tierfarmen *Escherichia coli*; davon waren von 38 % antibiotikaresistenten Stämmen 21,6 % Colicinbildner. Sie wiesen besonders auf die Bedeutung des Wassers als Infektionsquelle hin.

Die Produktion von Colicinen soll für den colicinogenen Stamm einen bedeutenden Vorteil seiner einerseits innerartlichen, andererseits zwischenartlichen Konkurrenz mit den übrigen Stämmen von Enterobakterien in einer gegebenen Lebensumwelt darstellen. Bei der Kolonisierung des Darmtrakts Neugeborener, bzw. gnotobiotischer Tiere wirkt sich die Colicinogenie anscheinend nicht als Selektionsvorteil aus (KELSTRUP u. GIBBONS, 1969; IKARI et al., 1969). Dagegen scheint sie bei der Persistenz von Stämmen eine Rolle zu spielen (CRAVEN u. BARNUM, 1969). In Mischkulturen von colicinogenen und nicht colicinogenen Stämmen der Gattung *Escherichia* und *Salmonella* setzt sich anscheinend jedoch stets der colicinogene Stamm durch (ROLLE, 1969). Das könnte bedeuten, daß eine normale colicinogene Flora die Ansiedlung pathogener Stämme der gleichen Art verhindern kann (ROLLE, 1969). Stämme von *Escherichia coli*, die aus Fällen akuter bakterieller Dysenterie isoliert wurden, produzierten in 41 % der Fälle Colicine gegen Stämme von Shigellen, die zugleich aus denselben Patienten isoliert wurden (FILICHKIN et al., 1969). Umgekehrt wurde bei chronischer Dysenterie bei 47 % der Shigellen eine colicinogene

Aktivität gegenüber parallel dazu isolierten Stämmen von *E. coli* festgestellt. Die Colicinogenie bei *E. coli* kann sich als ein nützlicher Faktor in der Entfaltung eines Antagonismus gegenüber Shigellen erweisen, welcher Bedeutung für die Abwehr einer Infektion vom Makroorganismus hat (SMARDA, 1971; GEROK et al., 1973; FILICHKIN et al., 1973).

Col-Faktoren sind aber anscheinend an der derzeitigen Verbreitung von R-Faktoren, insbesondere bei *E. coli*, nicht unschuldig und zwar weil sie nicht nur ein natürliches Potential von Transferfaktoren zur Mobilisierung und Ausbreitung von Resistenzdeterminanten bieten, sondern auch weil sie Stämmen, die colicino-gen und antibiotikaresistent sind, eine Überlegenheit gegenüber anderen Vertretern ihrer Art geben, die sich auch bei Abwesenheit von Antibiotika auswirken kann (FREDERICQ u. DELHALLE, 1972 a u. b).

Tab. 2: Vorkommen von antibiotikaresistenten und R-Faktor-tragenden *Escherichia coli*-Stämmen in unterschiedlichem Untersuchungsmaterial

Art bzw. Herkunft des Untersuchungsmaterials	gegenüber Antibiotika resistent in %	davon R-Faktor- tragend in %	Autoren
Schweine, gesund	53	28	SØGAARD, 1973
Ferkel	61	81	LARSEN u. LARSEN, 1972
Schweine	-	100	LEBEK, 1972
Schweine, krank	-	73	TRUSZYNSKI et al., 1969
Kälber	-	100	LEBEK, 1972
"	100	-	MARKOVIC et al., 1972
" ,gesund	69	77	LARSEN u. LARSEN, 1972
" ,path. Stämme	41	33,3	HEEVER, 1972
" ,mit Enteritis	90	-	FORTUSHNYI u. TUPITSA, 1973
" ,mit Septikämie	40	-	POHL u. THOMAS, 1972
Kühe	3	-	LARSEN u. LARSEN, 1972
"	-	50	LEBEK, 1972
Pferd	-	8	LEBEK, 1972
Geflügel	75	50	RENAULT u. ROUX, 1972
Eier, ungewaschen	61	-	STEPHENS u. LAKHOTIA, 1973
Mensch, normal	-	63	LEBEK, 1972
" ,enteropath. Stämme	-	67,7	LEBEK, 1972
" ,Krankenhaus	54	30	REBROVA et al., 1972
" ,Harnwegsinfektion	95	43,9	PANSE u. WADHVA, 1973
" ,Faeces	87,3	46,6	NABBUT u. SALMO, 1973
" ,Urin	90,0	42,0	NABBUT u. SALMO, 1973
Kinder mit Enteritis	62	100	GARBER u. FRIMERMANN, 1973
" " "	100	89	NATOLI et al., 1971
Hund u. Katze (Cystitis)	70	-	HIRSCH, 1973
Salzwasser	50	20	FEARY et al., 1972
Abwasser, Tierfarmen	38	-	TOMESCU u. DECUN, 1972
Milch, Fleisch	36,5	1	HEEVER, 1972

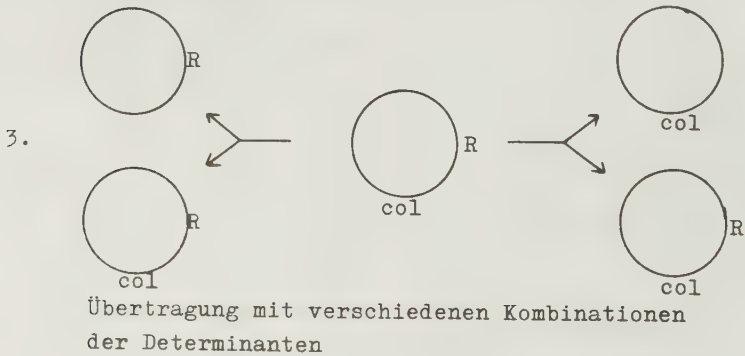
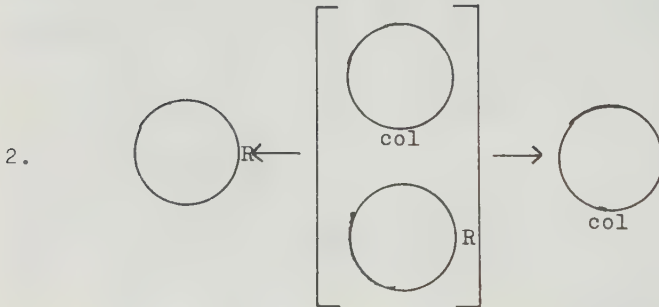
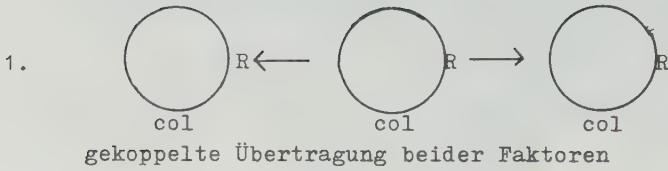


Abb. 2: Möglichkeiten der gleichzeitigen Übertragung von Resistenz- und Colicinfaktoren (nach KROMERY u. WIEDEMANN, 1972)

In den meisten Fällen scheinen die Gene für beide Eigenschaften unabhängig voneinander in der Zelle vorzukommen, so daß eine gemeinsame Übertragung bei der Konjugation mehr oder weniger häufig erfolgt (JACOB u. WOLLMANN, 1961; FREDERICQ, 1963; HAYES, 1964; WATANABE, 1967). In anderen Fällen jedoch werden beide Eigenschaften stets zusammen übertragen (Abb. 2). Dies zeigt an, in welcher engen Verbindung Colicin- und Resistenzgene innerhalb der gleichen genetischen Struktur ebenfalls auftreten können (FREDERICQ u. DELHALLE, 1972 a u. b). FREDERICQ (1969) hat die Rekombinationsfähigkeit von colicinogenen Faktoren mit einer Reihe anderer Episome und Plasmide nachgewiesen. Damit bestätigt sich auch die Verwandtschaft der Entstehung der beiden extrachromosomalen Elemente. Beide sind in der Lage mit Hilfe eines Fertilitätsfaktors die Konjugation herbeizuführen und die Bildung spezifischer Pili anzuregen. Sie werden, teilweise zusammen mit chromosomalem Material, übertragen. Daher besteht auch die nahe Verwandtschaft mit dem F-Faktor (SCAIFE, 1967). Eine Rekombination eines R-Faktors mit einem Col-Faktor konnte durch Transduktion eines Col B-Episoms bei einem R-Faktor-tragenden Stamm erreicht werden. Sie fand auch statt bei der Konjugation eines R- und Col-Faktor-tragenden Donor-Stammes mit einem $R^- Col^-$ -Rezipienten (FREDERICQ u. DELHALLE, 1972b u. 1973). Bei diesen Hybridisierungen konnten Resistenz- und Colicingene, die normalerweise von zwei bis drei getrennten Plasmiden getragen werden in verschiedenen Kombinationen erhalten werden und auch Rekombinationen mit chromosomalen Genen erzielt werden (s. Abb. 2).

WATANABE u. FUKASAWA (1960 u. 1961) fanden nur wenig colicinogene R-Faktor-tragende Stämme, wobei R- und Col-Faktor immer getrennt voneinander übertragen wurden. Manche Col-Faktoren können auch erst dann übertragen werden, wenn die Zelle einen RTF-Faktor erlangt

(IIJIMA, 1962; DUBNAU u. STOCKER, 1967). Allerdings ist die Frequenz der gemeinsamen Übertragung geringer, als wenn der Col-Faktor durch den F-Faktor übertragen würde. Andererseits kann ein defekter R-Faktor durch Eindringen von exogenen Fertilitätsfaktoren (z.B. eines Col-Faktors) mobilisiert werden. Ein defekter R-Faktor entsteht, wenn während des Konjugationstransfers die Konjugationsbrücke unterbrochen wird und in den Empfängerzellen und ihren Nachkommen ein Teilstück des R-Faktors verbleibt, das trotz seiner extrachromosomalen Lokalisierung nicht ausbreitungsfähig ist.

So wird z.B. der R-Faktor gegen Streptomycin durch Col I mobilisiert und gemeinsam mit ihm übertragen (ANDERSON u. LEWIS, 1965). KRCMERY u. JANOUSKOVA (1969a) verzeichneten eine Mobilisierung der Resistenz gegenüber Tetracyclin (s.a. ANDERSON, 1968) und von anderen Resistenzdeterminanten durch einen nicht näher definierten Col-Faktor, der bei bis zu 30 % der Stämme vorkam. Zwischen R- und Col-Faktor gibt es Inkompatibilitäten, d.h. sie können nicht gemeinsam in einer Zelle koexistieren. Manche R-Faktoren können die Exklusion der Col-Faktoren bewirken (KATO et al., 1962; KRCMERY et al., 1970), bzw. die Colicinsynthese unterbinden (MULCYK u. LAWRENCE, 1966). Ein fi^+ R-Faktor verhindert den Transfer von Col E aus dem Donor und zwar durch die Suppression des F-Faktors (WATANABE u. FUKASAWA, 1962; MEYNELL et al., 1968).

Ferner wurde bei *Escherichia coli* eine Superinfektionsimmunität zwischen bestimmten fi^+ R-Faktoren und dem Col B-Faktor nachgewiesen (CLOWES et al., 1968; FRYDMAN u. MEYNELL, 1969).

fi^- R-Faktoren scheinen eine größere Homologie mit colicinogenen Faktoren zu besitzen, da sie häufiger als fi^+ Faktoren mit ihnen vergesellschaftet vorkommen.

In einem Teil der Fälle wurden beide extrachromosomalen Elemente auch gemeinsam übertragen (LEBEK, 1972a).

Tab. 3: Unterschied von fi^+ und fi^- R-Faktoren bei *E. coli* nach LEBEK (1972a)

Anzahl untersuchter R-Faktoren	Genfunktionen	Typ	
		fi^+	fi^-
137	Vergesellschaftet mit Col-Faktor	14	12
	Gemeinsame Übertragung von R + Col-Faktor	9	7
	Anzahl der R-Faktoren	75	30

Der R-Faktor verhindert gleichfalls die Übertragung von Col V durch Konjugation, wenn beide in demselben Donor vorhanden sind (WATANABE u. FUKASAWA, 1962; KUDLAY u. BALANIN, 1968).

Sehr häufig war der Col-Faktor E_2 mit dem R-Faktor mit Resistenzdeterminante gegenüber Tetracyclin und Ampicillin assoziiert. Anscheinend kann der Col-Faktor manchmal einen Teil des R-Faktors ersetzen (FREDERICQ et al., 1971). Die Ähnlichkeit zwischen den fi^- Faktoren und den Col-Faktoren der Gruppe I ist so groß, daß jeder dritte fi^- R-Faktor zugleich die Bildung vom Colicintyp I bewirken soll (MEYNELL, 1969). Diese Faktoren wurden also ganz zufällig als R-Faktoren bezeichnet, ebenso gut könnte man sie als Col-I-Faktoren ansehen (SMARDA, 1971). Einige natürlich vorkommende R-Faktoren, die nicht colicinogen sind, scheinen aber auch die Resistenz gegenüber Colicinen zu tragen (SICCARDI, 1966; ARAI et al., 1970; FREDERICQ, 1971). Diese R-Faktoren könnten aus einer Mutation entstanden sein, die sich

auf die Colicinproduktion auswirkt, aber nicht die Immunität gegen Col-Faktoren einschließt.

NAVASIN u. FOMINA (1972) fanden Colicinogenie bei 66 % der sensiblen und 48-50 % der Stämme mit Mehrfachresistenz. Allerdings konnten sie keine ausgesprochene Relation zwischen Mehrfachresistenz und anderen Merkmalen wie Colicinogenie, hämolytische Aktivität und anderen durch Episome kontrollierten Eigenschaften feststellen. FREDERICQ et al. (1971) konnten bei hämolysierenden ferkelpathogenen Coli-Stämmen 59 % mit R-Faktoren für die Resistenz gegenüber Tetracyclin nachweisen und 31 % colicinbildende Stämme feststellen, von denen 35 % ihre Col-Faktoren übertrugen. Bei vier gleichzeitig Tetracyclin- und Streptomycin-resistenten Stämmen wurde die Resistenz zusammen mit dem Col-Faktor übertragen. KRCMERY et al. (1972) fanden bei 100 gesunden Kindern 18 antibiotikaresistente E. coli-Stämme, davon trugen 15 einen R-Faktor. Sechs hatten R- und selbstübertragbare Col-Faktoren und acht R- und nicht selbstübertragbare Col-Faktoren. Von 100 an Pyelonephritis erkrankten Kindern konnten sie 72 antibiotikaresistente Stämme isolieren, von denen 33 R-Faktor-tragend waren und 13 selbstübertragbare bzw. 14 nicht selbstübertragbare Col- und R-Faktoren aufwiesen.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 MATERIAL UND METHODEN

3.1.1 Herkunft der E. coli-Stämme

Die E. coli-Stämme, die vergleichend auf Arzneimittelresistenz und auf Colicinogenie untersucht wurden, stammten zum einen aus Untersuchungsmaterial der Diagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin des Fachbereiches Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität, zum anderen wurden sie aus der Faecalflora von Kälbern isoliert, die vom Institut für Tierhygiene des Fachbereiches Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München innerhalb eines Mastversuches mit dem üblichen Zusatz eines Fütterungsantibiotikums in den ersten vier Monaten des Jahres 1973 gehalten worden waren.

Bei dem Untersuchungsmaterial der Diagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin handelte es sich ausnahmslos um innere Organe in den Monaten November 1972 bis August 1973 an einer Colibacillose verendeter Kälber oder Ferkel. 103 von insgesamt 460 untersuchten E. coli-Stämmen wurden aus diesem Untersuchungsgut isoliert.

Die anderen 357 Stämme wurden bei wiederholten Faecesuntersuchungen in der Zeit vom 24.1.73 bis 11.4. 73 aus dem Kot von 82 Allgäuer Braunviehkälbern gezüchtet. Von den auf vier Gruppen aufgeteilten Tieren erhielten 40 Kälber täglich 80 ppm Zinkbacitracin und 18 Kälber 12 ppm Flavomycin mit dem Milchaustauscher über 84 Tage verabreicht. 23 Kälber wurden als Kontrolle ohne jeglichen Antibiotikumsatz zum Futter gehalten. Letztere (Gruppe K) waren mit 22 Zinkbacitracin gefütterten Kälbern (Gruppe Z₂) im Laufstall, nur durch

eine Barriere voneinander getrennt, untergebracht. Die anderen zwei Gruppen zu jeweils 18 Tieren (Gruppe Z₁ und F) waren dagegen in Einzelboxen in zwei nicht miteinander korrespondierenden Räumen aufgestellt worden. Gemäß der Aufstallung erfolgte die Tränke entweder manuell oder mittels Automatik (s.Tab. 4). Sie wurde während des gesamten Versuchszeitraumes nur von einer Person durchgeführt, die keinen Kontakt zu anderen Tieren hatte und welche auch für die Reinigung der Eimer und sonstigen Geräte, die Sauberkeit im Stall und die Vermeidung der Verschleppung von Keimen (z.B. von einem Stall zum anderen) Sorge zu tragen hatte.

Tab. 4: Einteilung der Gruppen im Kälberversuch

Gruppen- bezeichn.	Tier- zahl	zugefüttertes Antibiotikum	Art der Aufstallung	Fütterung
F	18	Flavomycin 12 ppm	Einzelhaltung, Box	Eimertränke, manuell
Z ₁	18	Zinkbacitracin 80 ppm	Einzelhaltung, Box	
Z ₂	23 ^{**}	Zinkbacitracin 80 ppm	Laufstall, Spaltenboden	Eimertränke, automatik
K	23 [*]	Kontrolle	Laufstall, Spaltenboden	

* ein Tier in 5. Versuchswoche verendet

** ein Tier in 11. Versuchswoche geschlachtet

An den ersten zwei Tagen nach der Aufstallung erhielten alle Tiere, wie in der Praxis heutzutage allgemein üblich, zur Durchfallprophylaxe ein Kombinationspräparat, bestehend aus 75 g Chlortetracyclin, 30 g Dihydrostreptomycin, 10 g Procain-Penicillin G und Vitaminen sowie Milchzucker ad 1000 g (Maibacter[®] der Fa. Deutsche Farmitalia GmbH, Freiburg) oral morgens und abends mit der Tränke verabreicht. Die Menge betrug jeweils 7 g pro Mahlzeit/Tier. Das Auftreten von Fieber und von Störungen des Allgemeinbefindens (Tab. 5) bei einigen Tieren während des Versuchs machte die Applikation von Chemotherapeutika erforderlich. Es wurde ein Sulfonamid (Supronal[®]) oder ein Kombinationspräparat aus Penicillin und Streptomycin (Tardomyocel[®]) oder ein neomycinhaltiges Präparat eingesetzt (vgl. hierzu HORNER, M.H., 1974, Vet.Med. Diss., Universität München). Auch bei Durchfall wurden Antibiotika oral gegeben, und zwar vor allem der Gruppe F mit Flavomycinbeifütterung, da er hier besonders lang anhielt und durch eine Kürzung der Futterration und die Verabreichung von Schwarztee vielfach nicht wie in den anderen Gruppen gestillt werden konnte. Nähere Einzelheiten darüber enthält Tabelle 5.

Tab. 5 : Übersicht über Häufigkeit von Erkrankungen in den einzelnen Gruppen während des Versuchszeitraumes von zwölf Wochen.

Gruppe	Art der Erkrankung	Anzahl der erkrankten Tiere je Versuchswoche											
		1.*	2.*	3.	4.	5.*	6.	7.	8.	9.	10.*	11.*	12.
F	Fieber	1	1	1			1	1		1			1
	Durchfall	9	8	3	4	3	1						1
Z ₁	Fieber		2	1	1		1						
	Durchfall	7	1		2							1	
Z ₂	Fieber						1	4	1	1			1
	Durchfall	4	2	2	4	1	1	2	1	2	1	2	2
K	Fieber			2	1		1						
	Durchfall	10	5	5	2	2	3	2	3	2	1	1	1

Anmerkung: Bei Auftreten von erhöhter Temperatur und Störung des Allgemeinbefindens erhielten die Tiere Sulfonamide oder Antibiotika in therapeutischen Dosen verabreicht (s. Methodik).

* In diese Zeit fielen die, in gewissen Abständen durchgeführten, Kotuntersuchungen.

3.1.2 Isolierung, Identifizierung und Konservierung der Stämme

Die Isolierung der Stämme erfolgte jeweils nach selektiver Anzucht der Keime auf einem bewährten Enterobacteriaceaeen-Nährboden, unter Berücksichtigung der für *E. coli* zutreffenden koloniemorphologischen Merkmale. Zur Überprüfung der Richtigkeit der Artdiagnose wurde das zur biochemischen Differenzierung von Enterobacteriaceae entwickelte und fachlich anerkannte (MARTIN et al., 1971; HUHTANEN et al., 1972) Enterotube[®]-System der Fa. Hoffmann-La-Roche, AG, eingesetzt und mit Hilfe der zehn dabei auswertbaren Reaktionen das Bestimmungsergebnis abgesichert. Es wurde jeweils von Einzelkolonien ausgegangen und nach positivem Testergebnis der Stamm auf einen zur Konservierung über Jahre geeigneten Nährboden überimpft. Bei dem Konservierungsagar handelt es sich um ein Substrat aus 10 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut (Merck Nr. 7214), 10 g Liebig-Fleischextrakt und 5 g NaCl, welches nach Lösen der Stoffe, in 500 ml Aqua dest., und Einstellen von pH 8,0 zunächst gekocht und filtriert wird und erst danach mit 20 g in 500 ml Aqua dest. über Nacht eingeweichtem Agar zusammengegeben und 30 Min. autoklaviert wird. Dann wird der Nährboden zweckmäßigerweise nochmals filtriert, und zwar durch Watte. In kleine Reagenzgläser (10 ml) werden anschließend jeweils 4,2 ml abgefüllt und diese nach nochmaligem Autoklavieren über 10 Min. bis zum Erstarren des Agars in die Schräglage gebracht und mit in heißes Paraffin getauchte Korken verschlossen.

Wenn sich die *E. coli* aus den inneren Organen verschiedener Tiere koloniemorphologisch voneinander unterscheiden hatten, wurde in solchen Fällen jede Wuchsform für sich nach vorheriger Überprüfung der Zugehörigkeit zu *E. coli* auf Konservierungsagar überführt, so daß

von einigen verendeten Tieren nicht nur ein Stamm hinsichtlich Arzneimittelresistenz und Colicinogenie getestet wurde. Außerdem wurde es für zweckmäßig gehalten, die *E. coli*-Stämme aus dem Sektionsmaterial auf die Zugehörigkeit zu bestimmten als enteropathogen geltenden Serotypen zu testen und sie hinsichtlich ihres Hämolysinbildungsvermögens zu prüfen. Dabei wurde die hierfür übliche Methodik verwendet, wie sie auch von HALLMANN und BURKHARDT (1974) beschrieben wird.

Bei der Untersuchung der *E. coli* von nicht an Colibacillose leidenden Kälbern wurde auf diese Art die Feststellung zusätzlicher Merkmale verzichtet, da von solchen Tieren hinreichend bekannt ist, daß die enteropathogenen, hämolysinbildenden Vertreter der Keimart bei diesen nicht den Hauptanteil bei der Flora stellen.

3.1.3 Spezielle Verfahren der Züchtung von *E. coli* aus Kot

Während bei dem verwerteten Diagnostikmaterial eine Anzucht der Keime für die Isolierung nicht erforderlich war (sie erfolgte routinemäßig durch das Institut), mußte sie allen Isolierungen aus der Faecalflora der im Fütterungsversuch stehenden Kälber vorangestellt werden. Dazu wurde den Kälbern rektal aus der Ampulle mit einem sterilen Handschuh Kot entnommen oder, wenn dies nicht möglich war, mit einem sterilen Tupfer ein Abstrich gemacht. Insgesamt wurde bis zur Schlachtung nach 12 Wochen fünfmal Kot entnommen. Damit wurden jeweils Verdünnungen hergestellt, aber die Methodik teilweise geändert, weil gleichzeitig verfolgt werden sollte, ob die Wahl des Verfahrens einen Einfluß auf das spätere Testergebnis hinsichtlich der Häufigkeit arzneimittelresistenter, colicinogener Stämme auszuüben vermag.

Bei den einzelnen Untersuchungen wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Kotuntersuchung am 24.1.73 (1. Woche des Versuchs):

Nach der ersten Kotentnahme von allen Tieren wurden von jeder Kotprobe 10 g resp. 1 g abgewogen, und die jeweilige Menge mit einem sterilen Spatel entweder in 90 oder in 9 ml selektive Anreicherungsbouillon, Brilliant Green Bile Broth, 2 % (Oxoid Nr. CM 31), überführt; nach 20 Minuten langem Schütteln wurde über Nacht bei 37° C bebrütet. Die Tupferproben wurden mit 9 ml Anreicherungsbouillon beschickt und diese ebenfalls über Nacht inkubiert. Jeder Bouillonansatz wurde danach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, und mit jeweils zwei Tropfen (0,05 ml) der Verdünnungsstufen 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} DST-Agarplatten (Sensitivity Test Agar, Oxoid Nr. CM 261, pH 6,1) beimpft, welche als Zusatz entweder 50 µg/ml Tetracyclin-

hydrochlorid oder 20 μ /ml Chloramphenicol enthielten. Nach 18-stündiger Bebrütung dieser Subkulturen bei 37° C wurde von der Verdünnungsstufe auf Konservierungsagar abgeimpft, bei welcher sich Einzelkolonien entwickelt hatten.

2. Kotuntersuchung am 31.1.73 (2.Woche des Versuchs):

Bei der zweiten Kotentnahme wurden nur Proben von den Tieren der Gruppe K und Z₂ (s. Tab. 4) genommen, wobei jeweils eine Öse Kot (20 mg) in 9 ml der selektiven Anreicherungsbouillon verrieben wurde. Nach 18 - 24 - stündiger Bebrütung bei 37° C wurde damit direkt eine Antibiotogrammbestimmung durchgeführt, wozu eine Öse bewachsene Bouillon entnommen, diese auf DST-Agar (ohne Zusätze) ausgespatelt und ein Teststern aufgelegt wurde. E. coli-Keime, die sich dabei als Tetracyclin-resistent erwiesen hatten, wurden auf Konservierungsagar abgeimpft und vorerst im Kühlschrank aufbewahrt.

3. Kotuntersuchung am 28.2.73 (5.Woche des Versuchs):

Nach der dritten Kotentnahme wurden die Keime nicht erst in der Anreicherungsbouillon vorkultiviert, sondern eine Öse Kot (20 mg) direkt in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung verrieben, von dieser Verdünnung 1:100 ausgehend, Verdünnungsreihen bis 10⁻⁷ angelegt und mit den einzelnen Verdünnungen wie bei der ersten Kotuntersuchung Platten beimpft.

4. Kotuntersuchung am 3.4.73 (10.Woche des Versuchs):

Nach der vierten Kotentnahme wurde mit dem Kot (wie oben) eine Verdünnung 1:100 hergestellt, davon eine Öse auf DST-Agar ausgespatelt und zur Prüfung auf Antibiotikaresistenz ein Teststern aufgelegt.

Kolonien Chloramphenicol-resistenter Keime wurden auf Konservierungsagar überimpft.

5. Kotuntersuchung am 11.4.73 (11.Woche des Versuchs):

Nach der fünften Kotentnahme wurde so vorgegangen wie bei der ersten Kotuntersuchung; es wurde aber auch ohne Einschaltung der Übernachtsbouillon direkt von den

Verdünnungen der Kotsuspension ein Tetracyclin- und Chloramphenicol-haltiger Agar beimpft. Alle resistenten Keime wurden auf Konservierungsagar abgeimpft, bebrütet und im Kühlschrank für die weiteren Untersuchungen aufbewahrt.

3.1.4 Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden

3.1.4.1 Anwendung des Agardiffusionsverfahrens

Mit allen E. coli-Stämmen, die entweder aus inneren Organen oder aus der Faecalflora isoliert worden waren, wurde eine Testung ihrer Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden im Agardiffusionsverfahren durchgeführt und die Sensibilität der Keime vor allem gegenüber jenen Stoffen geprüft, von denen das Vorhandensein von R-Faktoren bekannt ist. Es wurden für diesen Test die Standard-Antibiotika Tetracyclinhydrochlorid, Streptomycin, Chloramphenicol, ferner das Ampicillin, Kanamycin, Neomycin, Gentamycin und stellvertretend für alle Sulfonamide das Sulphafurazol ausgewählt. Wegen der noch nicht sehr breiten Anwendung des Polymyxin E in der Veterinärmedizin wurde interessehalber auch Colistin mit in die Testung einbezogen. Mit der Herstellung der Testblättchen wurde die Fa. Oxoid beauftragt, die mit den genannten Verbindungen achtermige Multodiscs anfertigte, von denen eine Serie (Code Nr. 4173 E) mit den Verbindungen (außer Neomycin) in niederen Konzentrationen beladen war. Die zweite Serie (Code Nr. 4172 E) wies dagegen neben Neomycin die Stoffe in hoher Beladung auf. Entsprechend den Empfehlungen der Fa. Oxoid waren für hohe und niedere Beladung die Konzentrationen der Blättchen festgelegt

worden. Sie betrugen von den

Testsubstanzen	bei	Code Nr. 4173 E= niedere Beladung	Nr. 4172 E= hohe Beladung
Tetracyclinhydrochlorid		10 mcg	50 mcg
Streptomycin		10 "	25 "
Chloramphenicol		10 "	50 "
Ampicillin		2 "	25 "
Kanamycin		5 "	30 "
Neomycin			10 "
Gentamycin		10 "	
Colistin (Polymyxin E)		10 "	50 "
Sulphafurazol		100 "	500 "

Bei der hohen Beladung lagen die mcg-Werte bewußt über jenen von BAUER et al. (1966), da das Testergebnis nicht in Relation zu den, mit diesen Stoffen im Handel befindlichen Präparaten gesetzt werden sollte, sondern eher Rückschlüsse auf Vorhandensein von R-Faktoren zu lassen sollte. Um insbesondere bei den Standardantibiotika dafür noch einen besseren Anhalt zu bekommen, wurde es für zweckmäßig gehalten, im Falle eines positiven Colicintests, die Stämme noch gegenüber höheren Konzentrationen im quantitativ verlässlicheren Reihenverdünnungstest zu untersuchen (s.Kap. 3.1.4.2).

Zur Anwendung des Agardiffusionsverfahrens wurden von den einzelnen Stämmen Keime vom Konservierungsagar auf Blutagar überimpft und dieser 18 - 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Von jedem Stamm wurden fünf Einzelkolonien miteinander verrieben und damit 5 ml Standard-I-Bouillon beimpft, welche über Nacht wiederum bei 37° C bebrütet wurde. Nach Verdünnung der Bouillon mit jeweils 5 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung wurde der Keimaufschwemmung eine Öse (0,01 ml) entnommen, die Flüssigkeitsmenge mit einem sterilen Drigalskispatel auf der Oberfläche einer DST-Agarplatte (Nährboden der Fa. Oxoid, Code Nr. CM 261) verteilt und darauf der sternförmige Papierträger mit den acht

Testblättchen (Multodisc der Fa. Oxoid) aufgelegt und angedrückt. Um den antibiotischen Stoffen Zeit zu lassen für eine Diffusion in das Agarsubstrat wurden die Platten für zwei Stunden in den Kühlschrank gestellt und erst im Anschluß daran bei 37° C bis zur Ablesung 18 Stunden lang bebrütet.

Als sensibel gegenüber den verschiedenen Konzentrationen der geprüften Stoffe wurden die Keime immer dann angesprochen, wenn sich ein deutlicher Hemmhof von mehreren Millimetern Breite gebildet hatte. Als unempfindlich, bzw. resistent, wurde ein Stamm nicht nur dann angesprochen, wenn überhaupt kein Hemmhof nachweisbar war, sondern auch unter der Voraussetzung, daß nur ein Teil der Population empfindlich gegenüber dem Stoff in der geprüften Konzentration reagierte.

Bei allen 103 Stämmen aus Organmaterial vom Kalb oder Ferkel wurde es für zweckmäßig gehalten, die Keime sowohl gegenüber der niederen als auch der hohen Beladung zu testen. Bei einer Antibiotikatherapie vor dem Tod der Tiere konnten hohe therapeutische Dosen eine Selektion von Keimen mit geringer Empfindlichkeit gegenüber den Chemotherapeutika bewirkt haben.

Bei den Stämmen, die aus der Faecalflora von Kälbern, die nicht in der Therapie Verwendung findende Antibiotika als Futterzusatz erhielten und nur in Ausnahmefällen mit einem solchen Antibiotikum oder Sulfonamid behandelt worden waren, isoliert wurden, erfolgte eine Testung nur gegenüber der niederen Beladung. Lediglich am Versuchsende wurde auch das Agardiffusionsverfahren mit der hohen Beladung angewendet, um feststellen zu können, wie es sich mit der Empfindlichkeit der Stämme in der Flora verhält, wenn über Wochen ein Antibiotikum verabreicht wird, welches nicht die Übertragung von R-Faktoren stimuliert, sondern diese gegebenenfalls sogar aus der Flora eliminiert.

3.1.4.2 Durchführung des Reihenverdünnungstests

Der Reihenverdünnungstest wurde zur Feststellung der minimalen Hemmkonzentration mit den Antibiotika Tetracyclinhydrochlorid, Streptomycin und Chloramphenicol durchgeführt. Als Medium fand Mueller Hinton Broth der Fa. Difco Verwendung, welcher abgestufte Mengen der drei Antibiotika vor der Keimfreimachung durch Seitzfilter zugesetzt wurden. Nach dem sterilen Abfüllen in Mengen von jeweils 5 ml in Reagenzgläsern enthielten die Röhrchen von den drei Antibiotika 64, 128 resp. 256 mcg/ml Bouillon. Bei Streptomycin wurde auch die Konzentration 32 mcg/ml geprüft. Bei der Einstellung des pH fand der Wert einer optimalen Wirkung Berücksichtigung.

Insgesamt wurden 87 Stämme diesem zusätzlichen Test unterzogen, nämlich alle jene Stämme, die sich im Agardiffusionstest als mehrfach resistent ausgewiesen hatten und bei welchen im Colicintest colicinogene Eigenschaften festgestellt worden waren. Dies traf zu für 44 Stämme aus Organen an Colibacillose verendeter Tiere und 43 Stämme aus der Faecalflora der im Fütterungsversuch stehenden Kälber, die entweder zu Beginn oder am Ende des Versuchs isoliert worden waren. Die Stämme wurden dabei wie für das Agardiffusionsverfahren vorkultiviert und mit einem Tropfen verdünnter Bouillonkulturen jeweils die Teströhrchen beimpft. Die Auswertung erfolgte am anderen Tag nach 18-stündiger Bebrütung bei 37° C anhand des Wachstums in den Teströhrchen.

3.1.5 Bestimmung der Colicinogenie

Der Nachweis der Bildung von Colicinen wurde mit dem Verfahren von GEDEK und WEINMANN (1971) geführt und als Indikatorstämme die hierzu von FREDERICQ freundlicherweise erhaltenen 17 Testkeime verwendet. Das Verfahren von GEDEK und WEINMANN schreibt einen Grundnährboden, bestehend aus 40 g Blood Agar Base (Oxoid, CM 55), 20 g Casamino Acids (Difco Nr. 0231/01), 4 g Hefeextrakt (Difco Nr. 0127-02) ad 1000 ml Aqua dest. (pH 7,2), vor, welcher jeweils am Tag zuvor hergestellt und am Tag des Versuches in Mengen von 20 ml in Petriglasschalen mit einem Durchmesser von 12 cm pipettiert wurde. Vor der Beimpfung der Platten, mit einem von W. GEDEK konstruierten Metallstempel, wurden die zu testenden Stämme in Bouillon angezüchtet. Die Vertiefungen im Unterbau des Stempels mit einem Fassungsvermögen von jeweils einem Milliliter wurden mit der Bouillon gefüllt, der Stempel eingetaucht und vorsichtig auf die vorbereiteten Agarplatten gedrückt. Nach dem Eintrocknen der Tropfen wurden die Platten jeweils 48 Stunden bei 37° C bebrütet. Zur Abtötung der Keime wurden dann in den Deckel, der auf dem Kopf stehenden Petrischalen, 2 ml Chloroform pipettiert. Nach einer Einwirkungszeit von zwei Stunden wurden die Platten eine Stunde zur Abdampfung des Chloroforms belüftet. Mit den Teststämmen wurden jeweils frische Bouillonkulturen hergestellt, und diese vor dem Übersichten der Agarplatten zur Erzielung einer möglichst homogenen Keimverteilung zehn Minuten mit 400 U/Min. geschüttelt. Die nach dem Überfluten der Agarplatte verbleibende Flüssigkeit der Testkultur wurde jeweils abgegossen. Die Beurteilung der Platten erfolgte nach 18-24-stündiger Bebrütung bei 37° C. Gegenüber den 17 Teststämmen war jeweils eine Testung

von 8 resp. 16 Stämmen gleichzeitig möglich. Die Bildung der einzelnen Colicine konnte anhand des Auftretens einer runden Hemmzone um den zu prüfenden Stamm innerhalb eines sonst geschlossenen Rasens des Indikatorstammes abgelesen werden . Nähere Angaben über die 17 Indikatorstämme enthält Tabelle 6. Insgesamt wurden 440 E. coli-Stämme mit diesem Verfahren geprüft.

Tab. 6: Angaben zur Charakterisierung der bei der Prüfung auf Colicinogenie verwendeten Teststämme

Bezeichnung	Artzugehörigkeit	Indikatorstamm für Colicin	Benennung mit Zahlen-bzw. Buchstabensymbolen
CA. 7	E. coli	V + M	1
CA. 18	E. coli	B + M	2
CA. 23	E. coli	D	3
CA. 31	E. freundii	A	4
CA. 38	E. coli	E + I ³⁾	5
CA. 42	E. coli	F	6
CA. 46	E. coli	G	7
CA. 53	E. coli	I a	8
CA. 57	Paracoli	C	9
CA. 58	E. coli	H	0
CA. 62	Paracoli	J + I	A
K. 235	E. coli	K + X	B
P 1	Sh. boydii	S 1	I
P 9	Sh. sonnei	S 3 + I ²⁾	II
P 14	Sh. dispar	S 5 ¹⁾	III
P 15	Sh. dispar	S 4	IV
Row	E. coli	empfindlich für alle Colicine	

1) = E₁ 2) = E₂ 3) = E₃ + I b

Stämme für Colicine I b, L, N, P und Q waren leider nicht erhältlich

3.2 ERGEBNISSE UND DEREN BESPRECHUNG

3.2.1 E. coli-Stämme aus Sektionsmaterial

Innerhalb eines Zeitraumes von zehn Monaten der Jahre 1972/1973 wurden in der beschriebenen Weise aus inneren Organen von 47 an Colibacillose erkrankter und verendeter Ferkel 63 E. coli-Stämme und von 32 Kälbern, die während der gleichen Zeit an einer Coliseptikämie eingegangen waren, 40 E. coli-Stämme isoliert und mit Hilfe der Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber antibakteriell wirksamen Chemotherapeutika sowie der Befähigung der Bildung von Colicinen näher charakterisiert. Da nicht in allen Fällen die angezüchteten E. coli ihrer Wuchsform nach einheitlich waren, übertrifft die Zahl der aus dem Untersuchungsgut isolierten und geprüften Stämme die der untersuchten Tiere. Insgesamt wurden 103 E. coli-Stämme aus diesem Sektionsmaterial hinsichtlich Arzneimittelresistenz und Colicinogenie getestet.

3.2.1.1 Ergebnisse der Prüfung auf Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden

Bei der Testung dieser 103 E. coli-Stämme aus Sektionsmaterial im Agardiffusionsverfahren gegenüber neun verschiedenen Chemotherapeutika (s. Tab. 7) unter Verwendung von Testblättchen, teilweise mit niederer und hoher Beladung der gleichen Stoffe, erwiesen sich alle Stämme als empfindlich gegenüber Colistin und Gentamycin in einer Konzentration von ≤ 10 mcg/disc. Dagegen sprachen über 80 % aller Stämme nicht auf die gleiche Menge Tetracyclin-HCl sowie auf 2 mcg/disc Ampicillin an. Der Prozentsatz hinsichtlich der Resi-

stanz gegenüber 10 mcg/disc Streptomycin mit 69,90 % der Stämme und gegenüber 100 mcg/disc Sulphafurazol mit 60,19 % der Stämme war wider Erwarten hoch, desgleichen vor allem auch die Resistenz gegenüber 10 mcg/disc Chloramphenicol mit fast 50 % der aus dem Untersuchungsgut kranker Tiere isolierten Stämme. In Gegenwart höherer Konzentrationen ergaben sich im Falle von Streptomycin, Sulphafurazol, Chloramphenicol sowie auch von Kanamycin keine nennenswerten Unterschiede. Lediglich bei Tetracyclin-HCl und Ampicillin lagen größere Differenzen in Bezug auf den Prozentsatz der Stämme, die auch noch gegenüber der höheren Beladung (50 bzw. 25 mcg/disc) resistent waren, vor.

Bei Berücksichtigung, von welcher Tierart die Stämme isoliert worden waren, zeigte sich nicht nur, daß die Stämme vom Kalb häufiger gegenüber einem Stoff in Dosierung der hohen Beladung unempfindlich waren, sondern daß die Quote gegenüber Chloramphenicol resistenter Stämme ungleich höher war, als die der Stämme vom Ferkel. Dies traf auch zu für die Resistenz gegenüber Streptomycin, Kanamycin, Neomycin und dem Sulfonamid Sulphafurazol. Beim Ferkel war lediglich die Unempfindlichkeit der Stämme gegenüber der niederen Beladung von Tetracyclin-HCl und Ampicillin auffallend hoch, nämlich 50 % von insgesamt 61,17 % der Stämme, die von dieser Tierspezies isoliert worden waren. Lediglich zwei Stämme der 103 insgesamt geprüften E. coli-Stämme aus dem Sektionsmaterial sprachen auf alle Stoffe (niedere und hohe Beladung) an; sie stammten vom Kalb. Alle anderen erwiesen sich gegenüber einem oder mehreren der geprüften antibakteriell wirksamen Chemo-therapeutika als resistent.

Tab. 7 : Unempfindlichkeit von Escherichia coli-Stämmen
aus Sektionsmaterial gegenüber neun verschiedenen
Chemotherapeutika.

$n_{\text{Ferkel}} = 47$

$n_{\text{Kalb}} = 32$

Antibiotikum bzw. Sulfonamid in mcg/disc		P r o z e n t u a l e r A n t e i l		
		a) sämtlicher ge- prüfter Stämme	b) Stämme v. Ferkel	c) Stämme v. Kalb
Tetracyclin-HCl	10	84,47	50,49	33,98
	50	64,08	38,83	25,24
Streptomycin	10	69,90	39,81	30,10
	25	67,96	39,81	28,16
Chloramphenicol	10	46,60	19,42	27,18
	50	44,66	17,48	27,18
Ampicillin	2	82,52	51,46	31,07
	25	25,24	11,65	13,59
Kanamycin	5	29,12	14,56	14,56
	30	26,21	11,65	14,56
Neomycin	10	26,21	11,65	14,56
Colistin	10	0		
Gentamycin	10	0		
Sulphafurazol	100	60,19	31,07	29,12
	500	57,28	28,16	29,12
= insgesamt		100,00 (103)	61,17(63)	38,83(40)
davon resistent				
mit niederer Beladung		98,06 (101)	59,23(63)	38,83(38)
mit hoher Beladung		82,25 (85)	51,46(53)	31,06(32)

Anmerkung: In () hinter den Prozentsen stehende Zahlen geben
jeweils die Anzahl der Stämme an.

Tab. 8 : Häufigkeit bestimmter Resistenzbilder bei E.coli-Stämmen aus Sektionsmaterial.

Resistenz- bild	Ergebnisse der Antibiogramme			
	1. niedere Beladung		2. hohe Beladung	
	A n z a h l d e r S t ä m m e			
	a) Ferkel	b) Kalb	a) Ferkel	b) Kalb
TSCAKSU	10	11	7	7
TSCAK		1		1
TSCASU	7	10	2	3
TSCKSU		3	1	4
TSAKSU	1			
SCAKSU			1	1
TSCSU	1	2	5	7
TSASU	8	3		1
TAKSU	1			
SCASU	1	1	1	
SCKSU				2
TSA	8		1	
TSK			1	
TSSU	2		6	1
TAK	2			
SCSU			1	2
SKSU			1	
SASU	1			
CASU				1
TS	1		5	
TA	6	4		
TK	1		1	
TSU			1	1
SC	1			
SSU			3	
T	4	1	10	1
S			6	
A	8	2		

Über die Resistenzbilder der mit den einzelnen Stämmen durchgeführten Antibiotogramme und die Häufigkeit im Auftreten bei Kalb und Ferkel gibt Tab. 8 Auskunft. Dabei fällt ein gehäuftes Auftreten bestimmter Resistenzbilder bei beiden Tierarten auf, wobei ablesbar wird, daß eine Mehrfachresistenz beim Kalb die Unempfindlichkeit gegenüber Chloramphenicol miteinschloß, während beim Ferkel andere Resistenzbilder diesem gegenüber dominierten und Monoresistente (80 %) häufiger waren.

Da mit dem Vorhandensein einer Unempfindlichkeit gegenüber mehreren Stoffen gleichzeitig, und zwar vor allem in der höheren Dosierung, die Wahrscheinlichkeit wächst, daß diese Resistenz durch R-Faktoren determiniert ist, ergibt sich daraus nach diesem Untersuchungsergebnis ein Vorkommen eines größeren Anteils von E. coli-Stämmen mit übertragbarer Resistenz beim Kalb als beim Ferkel. Der Prozentsatz gegenüber hoher Beladung mehrfachresistenter Stämme betrug beim Kalb 82 % gegenüber 59 % beim Ferkel, wobei sich zeigte, daß auch Monoresistenzen gar nicht so selten waren. Eine Resistenz gegenüber nur einem Stoff war aber nur gegenüber Tetracyclin-HCl, Streptomycin und Ampicillin zu verzeichnen, in keinem Fall gegenüber den anderen Stoffen, insbesondere nicht gegenüber Chloramphenicol. Von 31 gegenüber der hohen Beladung mehrfachresistenten E. coli-Stämmen vom Kalb waren nur drei nicht gegenüber ≥ 50 mcg/disc Chloramphenicol unempfindlich; beim Ferkel waren es dagegen 18 von 37 E. coli-Stämme mit Mehrfachresistenz bei der Prüfung mit hoher Beladung.

Bei einer Gegenüberstellung der Befunde von denjenigen Stämmen (47 Stämme), die aus den Organen gleicher Tiere (12 Ferkel und 9 Kälber) aufgrund voneinander abweichender Koloniemorphologie isoliert worden waren, zeigten die Stämme von jeweils vier der zwölf Ferkel

bzw. neun Kälber eine Übereinstimmung im Antibio-
gramm. Diese waren dann entweder gegenüber den Arznei-
stoffen in niederer Dosierung empfindlich, oder hoch-
resistent (s. Tab. 11 u. 12).

3.2.1.2 Ergebnisse der Prüfung auf Colicinogenie

Bei der Untersuchung der 103 E. coli-Stämme, von denen
sich 98 % nach dem Ergebnis der Prüfung auf Arznei-
mittelresistenz mit Hilfe des Agardiffusionsverfahrens
als mono- oder multiresistent erwiesen hatten, auf ihr
Colicinbildungsvermögen, erwiesen sich mit dem Ver-
fahren von GEDEK und WEINMANN (1971) 22 der 63 Stämme
von Ferkeln und 24 der 40 Stämme von Kälbern als coli-
cinogen. 44 der insgesamt 46 colicinogenen Stämme
bildeten nicht nur ein Colicin, sondern zwei und mehr.
Bei einem Stamm wurden bis zu 13 verschiedene Colicin-
typen nachgewiesen (s. Tab. 9). Eine gewisse Häufung
war nach der Aufstellung in Tab. 9 im Vorkommen von
drei, vier, sechs und sieben Colicinen gleichzeitig
zu verzeichnen. Insgesamt 44,7 % der aus Untersuchungs-
material verendeter Tiere isolierten E. coli-Stämme
waren zur Bildung von einem oder mehreren Colicinen
befähigt.

Tab. 9 : Häufigkeit der Bildung von ein oder mehreren
Colicinen bei den einzelnen colicinogenen
E.coli-Stämmen aus Sektionsmaterial.

Anzahl der gebildeten Colicine	Zahl der Stämme		insgesamt
	Ferkel	Kalb	
1	1	1	2
2	-	3	3
3	4	5	9
4	2	5	7
5	3	-	3
6	6	3	9
7	4	1	5
8	-	3	3
9	2	-	2
10	-	1	1
11	-	1	1
12	-	-	-
13	-	1	1

Tab.10 : Häufigkeit des Nachweises der verschiedenen
Colicine bei E. coli-Stämmen aus Sektions-
material

Gebildete Colicine	Symbol	Zahl der Stämme		Σ
		Ferkel	Kalb	
V + M	1	10	9	19
B + M	2	5	8	13
D	3	11	19	30
A	4	0	1	1
E + I	5	8	12	20
F	6	15	10	25
G	7	0	1	1
I	8	1	3	4
C	9	22	23	45
H	0	0	1	1
J + I	A	0	2	2
K + X	B	0	2	2
S 1	I	18	16	34
S 3 + I	II	16	9	25
S 5	III	12	5	17
S 4	IV	0	4	4
insgesamt als Colicin- bildner ermittelte Stämme		22	24	46

Am häufigsten wurde bei beiden Tierarten das Colicin C nachgewiesen, nämlich bei allen 22 Stämmen vom Ferkel und 23 von 24 insgesamt vom Kalb als colicinogen ermittelten Stämmen. Daneben wurden von den Stämmen vom Ferkel vor allem die Colicine vom Typ S 1, S 3 + I und S 5 sowie F und D, seltener die Typen V + M, B + M und E + I produziert. Die Bildung der Colicintypen A, G, H, J + I, K und S 4 war bei keinem Stamm nachweisbar. Dagegen entwickelten die colicinogenen Stämme vom Kalb alle mit den Indikatorstämmen von FREDERICQ erfassbaren Colicine. Bei ihnen bildeten jedoch die bei den Stämmen vom Ferkel nicht nachweisbaren Colicine A, G, H, J, K und S 4 gegenüber den auch beim Ferkel feststellbaren Colicinen die Minderheit (Tab. 10).

Beim Kalb dominierte neben dem Colicin vom C-Typ der D-Typ. Bei über der Hälfte der Stämme waren daneben Colicine vom Typ S 1, E und I feststellbar. Berücksichtigt man, daß die Colicintypen E, F, J, S 3 und S 5 zur Gruppe E zusammengefasst werden, so nahmen sie bei den Stämmen nach Colicin C die zweite Stelle in der Häufigkeit ein, gefolgt von den Colicinen vom Typ D und S 1. Die Colicine die vor allem bei enteropathogenen Serotypen vorkommen sollen, dominierten bei den Stämmen vom Kalb gegenüber denen vom Ferkel.

Eine Übereinstimmung in der Art der gebildeten Colicine war dennoch bei den Stämmen vom Ferkel resp. vom Kalb höchstens vier- bzw. fünfmal nachweisbar, wobei von den insgesamt 46 colicinogenen Stämmen aus Sektionsmaterial lediglich sieben Stämme Identität im Muster zeigten (s. Tab. 13 u. 14).

Bei einem Vergleich des Colicinbildungsvermögens von Stämmen, die aus dem gleichen Ferkel oder Kalb isoliert worden waren, koloniemorphologisch unterscheidbar waren, sich aber im Antibiotogramm gleich verhalten hatten, ergaben sich im Colicintest bei drei

von vier Ferkeln auch eine Übereinstimmung, indem sie sich einheitlich negativ verhielten (Tab. 11). Von den zwei Stämmen des vierten Ferkels mit gleichem Antibiotogramm (siebenfach-resistent) war der eine Stamm nicht colicinogen, während der andere vier verschiedene Colicine bildete. Unabhängig vom Ergebnis des Antibiotogramms waren die Stämme von fünf Ferkeln einheitlich keine Colicinbildner, bei vier weiteren Tieren erwies sich jeweils nur einer von zwei Stämmen als colicinogen; bei drei Tieren waren drei Stämme jeweils Colicinbildner, aber mit unterschiedlichem Colicinbildungsmuster, bei einem Ferkel war daneben auch ein nichtcolicinogener Stamm anzutreffen. Bei den 18 Stämmen von neun Kälbern hatte das Antibiotogramm auch bei vier Tieren eine Übereinstimmung ergeben, wobei bei drei Tieren der eine Stamm Colicine bildete, der andere dagegen nicht. Die einzigen zwei Stämme, die überhaupt als sensibel gegenüber den geprüften Chemotherapeutika aus dem Untersuchungsmaterial isoliert worden waren, erwiesen sich als nichtcolicinbildend (s. Tab. 12). Unabhängig vom Antibiotogramm wiederum ließ sich feststellen, daß nur bei drei Tieren eine Übereinstimmung im Colicintest vorlag, nämlich bei einem Tier eine Colicinbildung bei beiden Stämmen mit gleichem Colicinmuster und bei zwei Tieren mit einer Unfähigkeit zur Colicinbildung. Bei allen anderen sechs Kälbern war jeweils einer der beiden Stämme aus dem gleichen Material Colicinbildner, der andere nicht. Bei Berücksichtigung der Ergebnisse beider Tierspezies dominierte diese Art des Vorkommens. Die Colicinbildner waren jedoch hier wie auch insgesamt innerhalb der Stämme aus Sektionsmaterial zahlenmäßig geringer vertreten als die nichtcolicinogenen *E. coli*.

Tab. 11 : Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika und Vorkommen colicinogener Eigenschaften bei verschiedenen E. coli-Stämmen aus inneren Organen gleicher Tiere (Sektionsmaterial/Ferkel)

Tier-Nr./ Stammbezeichnung	nachgewiesene Colicine** ($\emptyset$ = keine)	Resistenzbild nach dem Agar- diffusionsverfahren mit hoher und niederer Beladung
1908/1	$\emptyset$	T ₅₀ S ₂₅ SU ₅₀₀
1908/2	569/I/II/III	T ₅₀ S ₂₅ A ₂₅
2238/1	39/I	T ₁₀ S ₂₅ C ₁₀ K ₃₀ A ₂ SU ₅₀₀
2238/2	369/I/II/III	T ₁₀ S ₂₅ A ₂ SU ₅₀₀
2304/1	$\emptyset$	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂ SU ₅₀₀
2304/2*	$\emptyset$	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂ SU ₅₀₀
1696/1	$\emptyset$	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂ SU ₅₀₀
1696/2	$\emptyset$	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂ K ₃₀ SU ₅₀₀
2370/1*	$\emptyset$	A ₂
2370/2*	$\emptyset$	A ₂
2370/3	$\emptyset$	A ₂
2370/4	$\emptyset$	A ₂
678/1*	39/I	T ₅₀ A ₂ K ₅
678/2	59/II	T ₅₀ A ₂
2369/1	$\emptyset$	A ₂
2369/2	$\emptyset$	A ₂
2369/3*	$\emptyset$	A ₂
2369/4	$\emptyset$	A ₂
2374/1*	$\emptyset$	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂₅ K ₁₀ SU ₅₀₀
2374/2*	569/II/III	T ₁₀ S ₂₅ A ₂
1368/1*	$\emptyset$	T ₅₀ A ₂ K ₅ SU ₅₀₀
1368/2*	169/I/II/III	T ₅₀ A ₂
2373/1*	$\emptyset$	T ₅₀ S ₂₅ A ₂ SU ₅₀₀
2373/2*	169/I/II/III	T ₅₀ S ₂₅ A ₂
2373/3	1569/I/II/III	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂₅ SU ₅₀₀
978/1	359/I	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂₅ K ₃₀ SU ₅₀₀
978/2	$\emptyset$	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂₅ K ₃₀ SU ₅₀₀
1948/1*	$\emptyset$	T ₁₀
1948/2	$\emptyset$	T ₁₀ A ₂

** Symbole s.S.42

* haemolytisch

Tab.12 : Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika und Vorkommen colicinogener Eigenschaften bei verschiedenen E. coli-Stämmen aus inneren Organen gleicher Tiere (Sektionsmaterial/Kalb)

Tier-Nr./ Stammbezeichnung	nachgewiesene Colicine** (Ø = keine)	Resistenzbild nach dem Agar- diffusionsverfahren mit hoher und niederer Beladung
2316/1	Ø	T ₁₀ A ₂
2316/2	Ø	T ₅₀ A ₂
175/1	9	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂₅ K ₃₀ SU ₅₀₀
175/2	Ø	T ₁₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂₅ K ₃₀ SU ₅₀₀
714/1*	12369/II	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂₅ K ₃₀ SU ₅₀₀
714/2	Ø	T ₁₀ S ₁₀ C ₅₀ A ₂₅ SU ₅₀₀
738/1*	1569/I/II/III	T ₁₀ A ₂
738/2	Ø	T ₁₀ A ₂
2405/1*	Ø	
2405/2	Ø	
638/1*	359/I	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂ SU ₅₀₀
638/2	359/I	T ₁₀
2392/1*	Ø	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂ SU ₅₀₀
2392/2	12369/I/II/IV	T ₅₀ S ₁₀ A ₂ SU ₅₀₀
362/1*	359	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ SU ₅₀₀
362/2	Ø	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ SU ₅₀₀
1963/1	Ø	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂ K ₃₀ SU ₅₀₀
1963/2	12369/I/II/IV	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ SU ₅₀₀

* haemolytisch

** Symbole s.S.42

3.2.1.3 Ergebnisse der Prüfung der colicinogenen Stämme im MHK-Test gegenüber Standardanti- biotika

Bei der Bestimmung der Werte der absoluten Resistenz von 22 colicinogenen *E. coli*-Stämmen aus dem Sektionsmaterial von Ferkeln und 23 colicinogenen *E. coli*-Stämmen aus entsprechendem Untersuchungsmaterial von Kälbern gegenüber den drei Standardantibiotika Tetracyclin-HCl, Streptomycin und Chloramphenicol mit Hilfe des MHK-Tests ergab eine Dominanz gegenüber 128 mcg/ml Tetracyclin-HCl resistenter *E. coli* unabhängig von der Herkunft der Stämme vom Ferkel oder Kalb (Abb. 3 u. 4). In Gegenwart von Streptomycin oder Chloramphenicol wurden dagegen voneinander abweichende Ergebnisse erzielt. Während über die Hälfte der Stämme vom Ferkel von 64 mcg/ml Streptomycin und den darüberliegenden Konzentrationen nicht am Wachstum gehindert wurden (12 von 22 Stämmen) sprach nur ein Drittel der Stämme von Kälbern auf diese Mengen nicht an. Die Befunde der Testung der gleichen Stämme gegenüber Chloramphenicol stehen in einem echten Gegensatz zueinander. 17 von 22 Stämmen von Ferkeln wurden nämlich sogar durch 64 mcg/ml Chloramphenicol im Wachstum gehemmt, so daß die MHK für diese Stämme nur unterhalb dieser Konzentration bei diesem Antibiotikum liegen kann (Abb. 3). Bei den Stämmen vom Kalb waren es statt dessen 17 von insgesamt 23 getesteten Stämmen, die nicht einmal durch die Chloramphenicolmenge von 256 mcg/ml im Wachstum unterdrückt wurden, woraus sich für sie MHK-Werte oberhalb dieser Antibiotikumkonzentration ergaben (Abb. 4).

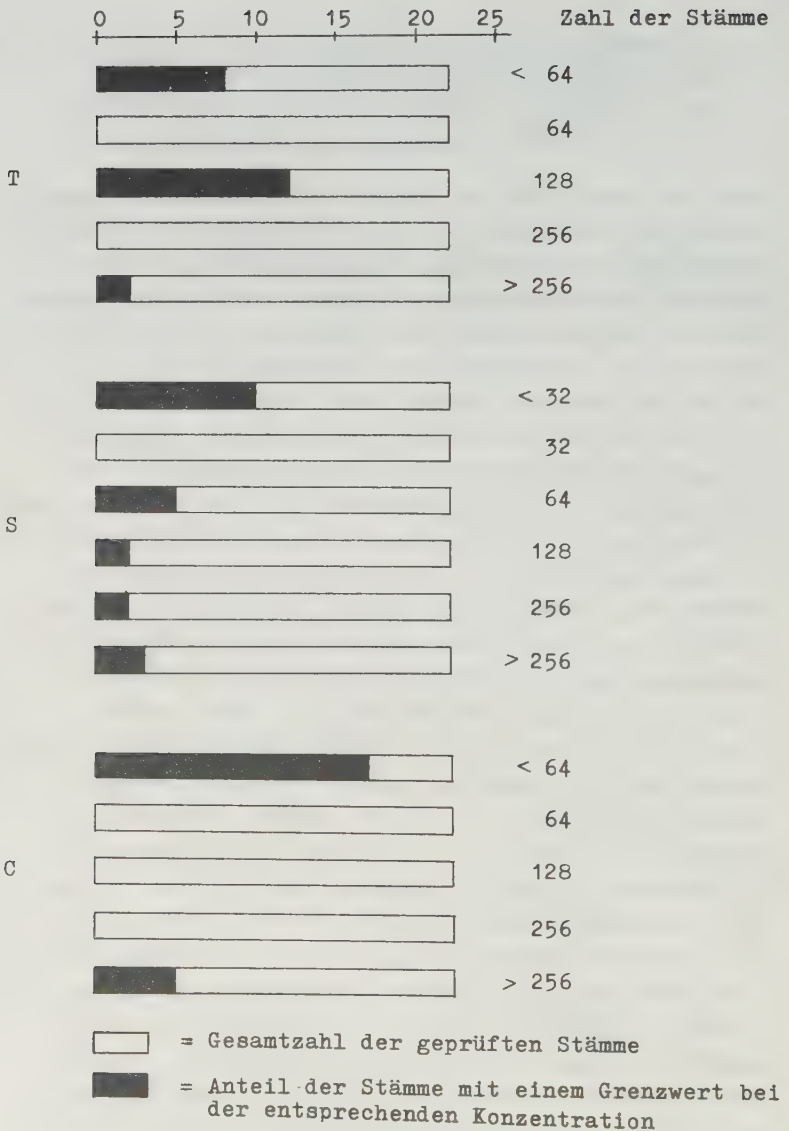
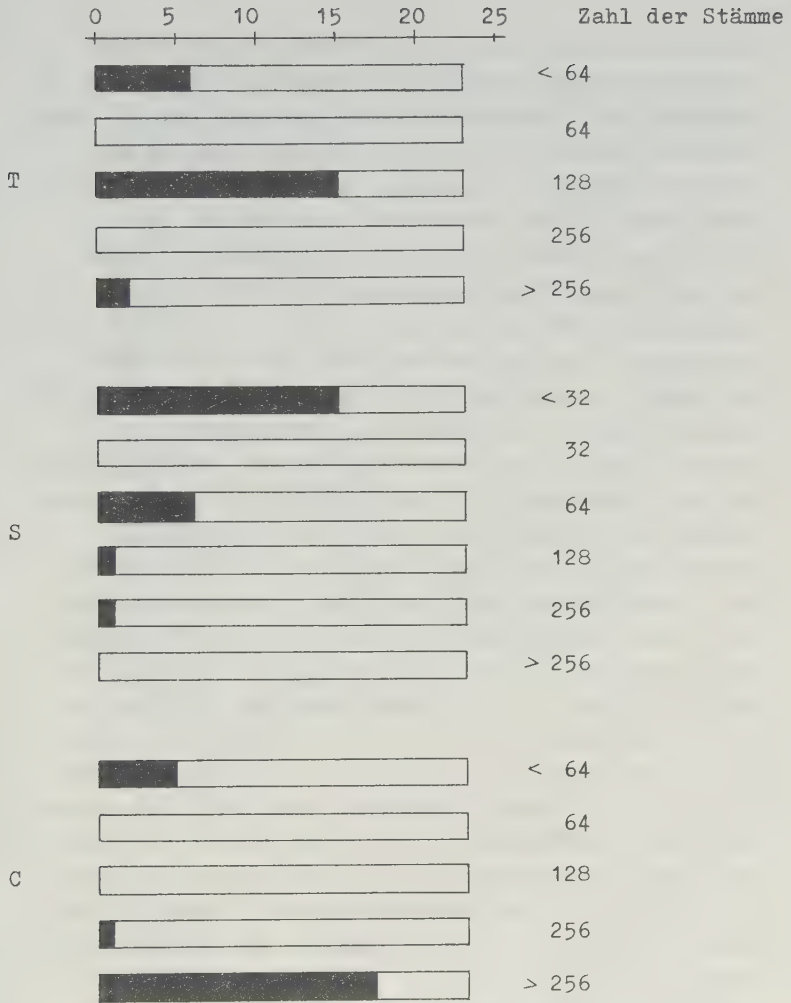


Abb. 3: Empfindlichkeit der 22 colicinogenen *E. coli*-Stämme aus Sektionsmaterial vom Ferkel gegenüber abgestuften Konzentrationen von Tetracyclin-HCl (T), Streptomycin (S) und Chloramphenicol (C) im MHK - Test in mcg/ml Mueller-Hinton-Broth, Difco.



Erklärung siehe Abbildung 3.

Abb. 4: Empfindlichkeit der 23 colicinogenen E. coli-Stämme aus Sektionsmaterial vom Kalb gegenüber abgestuften Konzentrationen von Tetracyclin-HCl (T), Streptomycin (S) und Chloramphenicol (C) im MHK - Test in mcg/ml Mueller-Hinton-Broth, Difco.

Da insbesondere bei einer Unempfindlichkeit von Bakterienstämmen gegenüber mehreren Antibiotika gleichzeitig in Konzentrationen oberhalb der mit den einzelnen Stoffen in vivo erzielbaren Blutspiegelwerte die Resistenz nur durch extrachromosomale Gene, R-Faktoren, determiniert sein kann (GEDEK, 1973; u.a.), ergibt sich daraus vor allem für die Stämme vom Kalb eine solche Beziehung zur übertragbaren Resistenz. Berechnet man jenen Anteil der Stämme, die danach von allen getesteten colicinogenen Stämmen als Träger von R-Faktoren in Frage kommen, ergibt sich eine etwa gleiche Relation in beiden Gruppen von Stämmen, die solche Plasmide aufweisen. Nur hinsichtlich der Resistenz, die sie kodieren, bestehen Unterschiede bei Stämmen vom Ferkel und Kalb. Bei den Stämmen vom Ferkel werden Tetracyclin- und Streptomycinresistenz häufiger durch sie determiniert, bei den Stämmen von Kälbern Tetracyclin- und Chloramphenicolresistenz. Differenzen, die sich insbesondere bei der Prüfung der Resistenz gegenüber Tetracyclinhydrochlorid bei der Anwendung des MHK-Tests im Vergleich zum Agardiffusionsverfahren ergaben, (s. Tab. 13 u. 14), sind damit erklärbar, daß beim Plattenverfahren in der Minderheit vorhandene höher resistente Keime unterdrückt werden, die sich bei der Züchtung in Bouillon beim Reihenverdünnungstest dagegen durchsetzen und hierbei das Testergebnis mit beeinflussen können.

Weitere Daten über das gemeinsame Auftreten von Merkmalen, für die extrachromosomale Gene der Bakterienzelle verantwortlich zeichnen, können den Tabellen der folgenden Kapitel entnommen werden.

Tab. 13 : Auftreten von Arzneimittelresistenz bei den 22 colicinogenen E.coli-Stämmen aus Sektionsmaterial vom Ferkel.

Stamm- bezeichnung	Nachgewiesene Colicine*	Ergebnis der Prüfung im	
		a) Agardiffusionsverfahren nied.u.hohe Beladung	b) MHK - Test* T S C
2355-Hly	9	T ₅₀ A ₂	< 64 < 32 < 64
691-0141	29/I	T ₅₀ A ₂	< 64 < 32 < 64
2238/1-Hly	39/I	T ₁₀ S ₂₅ C ₁₀ A ₂ K ₃₀ SU ₅₀₀	128 64 > 256
678/1-0138, Hly	39/I	T ₅₀ A ₂ K ₅	< 64 < 32 < 64
678/2-0141	59/II	T ₅₀ A ₂	< 64 < 32 < 64
2409	359/I	T ₅₀ S ₂₅ K ₃₀ A ₂ SU ₁₀₀	128 64 < 64
978/1-0139	359/I	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂₅ K ₃₀ SU ₅₀₀	128 > 256 > 256
1-0138	169/II/III	T ₁₀ S ₂₅ A ₂	128 < 32 < 64
2374/2-Hly	569/II/III	T ₁₀ S ₂₅ A ₂	128 > 256 < 64
276-Hly	69/I/II/III	T ₅₀	< 64 < 32 < 64
1368/2-Hly	169/I/II/III	T ₅₀ A ₂	128 64 < 64

Fortsetzung von Tabelle 13:

Stamm- bezeichnung	Nachgewiesene Colicine*	Ergebnis der Prüfung im	
		a) Agardiffusionsverfahren nied. u. hohe Beladung	b) MHK - Test* T S C
2373/2-Hly	169/I/II/III	T ₅₀ ^S ₂₅ A ₂	128 >256 < 64
844-08	169/I/II/III	S ₂₅ ^A ₂ SU ₅₀₀	< 64 128 < 64
6-0141	369/I/II/III	T ₅₀ ^S ₂₅ A ₂ SU ₅₀₀	< 64 64 < 64
2238/2-Hly	369/I/II/III	T ₁₀ ^S ₂₅ A ₂ SU ₅₀₀	128 < 32 < 64
1908/2-Hly	569/I/II/III	T ₅₀ ^S ₂₅ A ₂₅	128 256 < 64
2404	12369/I/II	T ₅₀ ^S ₂₅ C ₅₀ A ₂₅ SU ₅₀₀	128 256 >256
2412	12369/I/II	S ₂₅ ^C ₅₀ A ₂₅ SU ₅₀₀	128 < 32 >256
591-0141, Hly	1369/I/II/III	T ₁₀ ^S ₂₅ A ₂	>256 < 32 < 64
2373/3-0139	1569/I/II/III	T ₅₀ ^S ₂₅ C ₅₀ A ₂₅ SU ₅₀₀	>256 128 >256
1367	1235689/I/II	T ₅₀ ^S ₂₅ A ₂ SU ₅₀₀	128 64 < 64
147-0139	123569/I/II/III	S ₂₅ ^C ₁₀	- - -

*Erklärung für die gewählten Symbole s.S.42 u. S.56

Tab. 14 : Auftreten von Arzneimittelresistenz bei den 24 colicinogenen E. coli-Stämmen
aus Sektionsmaterial vom Kalb.

Stamm- bezeichnung	Nachgewiesene Colicine*	Ergebnis der Prüfung im	
		a)Agardifusionsverfahren nied.u.hohe Beladung	b) MHK - Test* T S C
175/1	9	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂₅ K ₃₀ SU ₅₀₀	128 < 32 >256
2343	39	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂₅ K ₃₀ SU ₅₀₀	128 128 >256
3-0117	9/I	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂₅ K ₃₀ SU ₅₀₀	128 64 >256
250-078	9/I	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂ SU ₅₀₀	< 64 < 32 >256
320-086	359	T ₁₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂ K ₃₀ SU ₅₀₀	128 < 32 >256
362/1-08	359	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ SU ₅₀₀	< 64 < 32 256
17-086	359	T ₅₀ S ₂₅ A ₂ SU ₅₀₀	128 64 < 64
325-086	39/I	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ K ₃₀ SU ₅₀₀	> 256 < 32 >256
259-078	39/I	T ₁₀ S ₂₅ C ₅₀ K ₃₀ SU ₅₀₀	128 < 32 >256
119-08	359/I	A ₂	128 < 32 < 64
638/1-078, Hly	359/I	T ₅₀ S ₂₅ C ₅₀ A ₂ SU ₅₀₀	128 < 32 >256
638/2	359/I	T ₁₀	- - -

Fortsetzung von Tabelle 14 :

Stamm- bezeichnung	Nachgewiesene Colicine*	Ergebnis der Prüfung im	
		a) Agardiffusionsverfahren nied. u. hohe Beladung	b) MHK - Test* T S C
616	359/I	$T_{50} S_{25}^S C_{50}^A K_{25}^S SU_{500}$	128 256 >256
378-086	359/I	$T_{50} S_{25}^S C_{50}^A K_{30}^S SU_{500}$	>256 < 32 >256
1905-078	12356/II	$T_{50} S_{25}^S C_{50}^A K_{25}^S K_{30}$	< 64 64 >256
714/1-0138, Hly	12369/II	$T_{50} S_{25}^S C_{50}^A K_{25}^S K_{30}^S SU_{500}$	128 64 >256
375-0117	369/I/II/III	$S_{25} C_{50}^A A_2 SU_{500}$	< 64 < 32 >256
738/2-078, Hly	1569/I/II/III	$T_{10} A_2$	< 64 < 32 < 64
2411-078, Hly	123689/I/II	$T_{50} S_{25}^S C_{50}^A K_{25}^S SU_{500}$	128 < 32 >256
2392/2	12369/I/II/IV	$T_{50} S_{10}^S A_2 SU_{500}$	128 < 32 < 64
1963/2-078	12369/I/II/IV	$T_{50} S_{25}^S C_{50}^A SU_{500}$	128 < 32 >256
433-078	1235689/I/II/III	$T_{50} S_{25}^S C_{50}^A K_{25}^S SU_{500}$	128 64 >256
875	126890AB/I/III/IV	$T_{50} S_{25}^S C_{50}^A K_{25}^S SU_{500}$	128 < 32 >256
174-086, Hly	12345679AB/II/III/IV	A_2	< 64 64 < 64

* Erklärung für die gewählten Symbole s. S. 42 u. S. 56

3.2.1.4 Gegenüberstellung von Einzelbefunden der arzneimittelresistenten colicinogenen Stämme

Für die 46 Stämme, die sich von insgesamt 103 Stämmen aus Sektionsmaterial als resistent gegenüber Antibiotika und teilweise auch gegenüber Sulfonamiden bei der Prüfung auf Arzneimittelresistenz erwiesen hatten, und dabei nach der Testung auf Colicinogenie auch als Colicinbildner anzusprechen waren, ergaben sich sehr verschiedene Kombinationen in den Merkmalen im einzelnen. Wie den Tabellen 13 u. 14 entnommen werden kann, bestand nicht nur in den Merkmalskombinationen ein Unterschied nach der Herkunft der Stämme vom Ferkel oder Kalb, sondern auch bei den Stämmen von der gleichen Tierspezies zeigten sich keine Übereinstimmungen. Ausgehend von der Art der von einem Stamm gebildeten Colicine befanden sich darunter einige mit gleichen Colicinmustern, jedoch abweichendem Antibiogramm. Soweit dieses bei manchen Stämmen auch noch gleichartig lautete, ergaben sich nach dem Ergebnis des MHK-Tests letztlich noch Unterschiede in der Resistenzhöhe gegenüber den drei getesteten Standardantibiotika. Innerhalb des Untersuchungsgutes hat sich danach kein Stamm befunden, welcher Identität in den Merkmalen mit einem anderen Stamm gezeigt hätte.

Wird bei der Wiedergabe der Befunde im einzelnen nur berücksichtigt, ob ein colicinogener Stamm gegenüber den getesteten Chemotherapeutika ein-, zweifach oder darüber hinaus bis siebenfach resistent oder aber empfindlich war, so läßt sich aus der mehr bildhaften Darstellung der Ergebnisse der Antibiotogramme mit hoher Beladung in der Tab. 15 die starke Verteilung der Merkmale auf die verschiedenen Möglichkeiten unschwer ablesen. Bestimmte Merkmalskombinationen ergaben sich, auch ohne daß die Resistenz gegenüber einem bestimmten Stoff oder einer Gruppe von Stoffen genau definiert war, für ein und dasselbe Colicinbild höchstens zweimal, in der Merzzahl überhaupt nur ein einziges Mal (s.Tab. 15).

Tab.15 : Verteilung der Merkmale von Arzneimittelresistenz
und Colicinbildung bei den 46 colicinogenen E. coli-
Stämmen aus Sektionsmaterial.

Colicin- muster*	Gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden nach dem Antibiogramm mit hoher Beladung						<u>sensibel</u>
	<u>resistent</u> : 6-, 5-, 4-, 3-, 2-, 1-fach						
9	o						x
9/I	o		o				
39	o						
29/I							x
39/I	o		o	x			x
59/II							x
359			oo	o			
359/I	ox	o	o	x			oo
69/I/II/III							x
169/II/III							x
569/II/III							x
12356/II		o					
12369/II	o						
169/I/II/III					xx	x	
369/I/II/III				ox	x		
569/I/II/III				x			
12369/I/II		x	x				
1369/I/II/III							x
1569/I/II/III		x					o
12369/I/II/IV				o	o		
123689/I/II		o					
123569/I/II/III							x
1235689/I/II				x			
1235689/I/II/III		o					
126890AB/I/III/IV		o					
12345679AB/II/III/IV							o

Zeichenerklärung: o = Kalb x = Ferkel

* Anmerkung: Erklärung für die gewählten Symbole s.S.42

Von den insgesamt 26 verschiedenen Colicinmustern der Stämme aus Sektionsmaterial entsprachen bei nur vier Bildern jeweils zwei Stämme einander in der Zahl der vermutlich durch R-Faktoren determinierten Arzneimittelresistenz. Sie erwiesen sich jedoch jeweils nicht als zum gleichen Serotyp gehörig. Das traf auch für die zwei sensiblen Stämme vom Kalb mit dem Colicinbild 359/I zu. Der Nachweis von 26 verschiedenen Mustern der Colicinbildung bei 46 Stämmen ist überraschend hoch, und ergibt sich unter anderem daraus, daß beim Ferkel Kombinationen von Colicinen des Typs V, E, F mit S 3 und S 5 gegenüber den bei den Stämmen vom Kalb vorherrschenden Bildern mit den Colicinen vom Typ D und B mit E häufiger waren.

Wertet man dazu das Ergebnis der Prüfung der colicinogenen Stämme aus Sektionsmaterial auf Resistenz gegenüber Standardantibiotika im MHK-Test aus, unter Berücksichtigung der Ansprechbarkeit der Keime gegenüber dem im Agardiffusionsverfahren in relativ hoher Konzentration mitgetesteten Sulphafurazol, so ergeben sich weitere Unterschiede zwischen Stämmen, isoliert aus inneren Organen von Ferkeln einerseits und Kälbern andererseits (s.Tab. 13 u. 14).

Eine Resistenz, die auf dem Weg einer Konjugation en bloc übertragen werden kann, ist bei einer gleichzeitig bestehenden Unempfindlichkeit von Stämmen gegenüber Tetracyclinen, Streptomycin, Chloramphenicol und Sulfonamiden gegeben. Sie konnte beim Kalb häufiger nachgewiesen werden als beim Ferkel. Außerdem trat diese auch nur bei Stämmen vom Kalb mit Colicinogenie vom Typ der übertragbaren Colicine (V, B und Gruppe I entsprechend den Symbolen 1, 2 und 8) auf.

Bei dem Versuch, die 46 colicinogenen Stämme aus Sektionsmaterial durch die Bestimmung der Zugehörigkeit zu bestimmten enteropathogenen Serotypen und die Fähigkeit zur Hämolysinbildung noch näher charakterisieren zu können, und gegebenenfalls weitere Unterschiede in den Merkmalen dieser Stämme im Vergleich zu den anderen ohne colicinogene Eigenschaften, aber mit Resistenz gegenüber Chemotherapeutika aufzudecken, war die Mehrzahl der colicinogenen Stämme ihrer Antigenstruktur nach einer in Tabelle 16 verzeichneten O-Gruppe zuzuordnen. 53 der insgesamt diesbezüglich untersuchten 103 Stämme ließen sich serologisch klassifizieren, wobei sich beim Kalb eine größere Zahl von Stämmen zu einer der enteropathogenen O-Gruppen als gehörig erwies als bei den Stämmen vom Ferkel. Während von den 22 colicinogenen Stämmen vom Ferkel nur zehn zu den beim Schwein vorkommenden Serotypen gehörten und eine Reihe von Stämmen über die Fähigkeit zur Hämolysinbildung verfügten, ohne diesen O-Gruppen anzugehören, waren es 18 von 24 colicinogenen Stämmen vom Kalb, die sich damit näher charakterisieren ließen.

Ein Vergleich mit den nicht colicinogenen Stämmen zeigte, daß jedoch jeweils der Anteil jener Stämme, die ebenfalls den gleichen O-Gruppen zugeordnet werden konnten, nur wenig darunter lag. Das Auftreten bestimmter Colicinbilder war nicht korreliert mit der Zugehörigkeit des Stammes zu einer bestimmten Sero-Gruppe (s.Tab. 16).

Tab. 16 : Vorkommen von Arzneimittelresistenz*, Colicin- und Hämolysinbildung bei E.coli-Stämmen aus Sektionsmaterial mit Berücksichtigung ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten Serogruppen.

Anzahl der Stämme	davon colicin- bildend	haemolysin- bildend	serologisch typisierbar	als gehörig zur O - Gruppe:						
			8	78	86	117	138	139	141	
<u>1. mit Empfindlichkeit</u>										
gegenüber allen gepr. Verbindungen:										
Ferkel/Kalb	10/8	0/4	4/2	4/6	0/1	0/2	0/1	0/2	1/0	2/0 1/0
<u>2. mit Monoresistenz:</u>										
Ferkel/Kalb	16/1	10/0	8/0	9/0			3/0	2/0	4/0	
<u>3. mit Multiresistenz:</u>										
Ferkel/Kalb	37/31	12/20	15/6	14/20	1/0	0/10	0/5	0/2	9/1	2/0 2/2
Σ Ferkel/Kalb	63/40	22/24	27/8	27/26	1/1	0/12	0/6	0/4	13/1	6/0 7/2

* bezogen auf Unempfindlichkeit gegenüber Antibiotika und/oder Sulfonamiden nach dem Ergebnis des Agardiffusionstests mit hoher Beladung der Testblättchen (s. Methodik)

Zusammenfassend verdient die Häufung bestimmter Merkmale vor allem bei Stämmen vom Kalb herausgestellt zu werden. Bei *E. coli*-Stämmen dieser Tierspezies war die Resistenz gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden nicht nur allgemein höher, sondern diese trat gleichzeitig auch in größerem Umfang mit der Fähigkeit zur Bildung von Colicinen auf (s.Tab. 15). Die Zahl der dafür verantwortlichen R- und Col-Faktoren bei Stämmen vom Kalb übertraf qualitativ und quantitativ die derjenigen vom Ferkel, verschiedentlich korreliert auch mit der Zugehörigkeit der mehrfachresistenten und colicinogenen Stämme zu bestimmen, als enteropathogen geltenden Serotypen.

Da es den Anschein hatte, daß insbesondere der exzessive Gebrauch der Antibiotika beim Kalb Einfluß auf die in der Bakterienzelle extrachromosomal verankerten Eigenschaften hat, wurde Wert darauf gelegt, bei dieser Tierart Verfolgsuntersuchungen anzustellen, über die im folgenden Kapitel berichtet wird.

3.2.2 E. coli-Stämme aus der Faecalflora von Kälbern

Bei in gewissen Abständen durchgeführten Kotuntersuchungen von Kälbern, die in einem Fütterungsversuch standen und die im Vergleich zu einer antibiotikumfrei ernährten Kontrolle Flavomycin oder Zinkbacitracin als Futterzusatzstoff erhielten, wurden aus der Faecalflora dieser Tiere E. coli-Stämme isoliert und diese wie die Stämme von Ferkeln und Kälbern aus Sektionsmaterial mit gleichen Methoden auf Arzneimittelresistenz und Colicinogenie geprüft.

Insgesamt 321 Kotproben wurden von den 82, zur Überprüfung des nutritiven Effektes der bereits genannten Antibiotika Flavomycin und Zinkbacitracin aufgestellten, Kälbern entnommen und daraus 357 E. coli-Stämme gezüchtet. Da Wert darauf gelegt wurde, vor allem jene E. coli von Kälbern zu erfassen, die gegenüber Standardantibiotika und Sulfonamiden resistent sind und zudem möglicherweise auch über colicinogene Eigenschaften verfügen, wurden zur Anzucht verschiedene Verfahren benutzt und als Selektivantibiotika Tetracyclinhydrochlorid und Chloramphenicol verwendet.

Durch eine Vorkultur der Keime in einer speziellen Anreicherungsbouillon für Enterobacteriaceae sollte erreicht werden, daß in der Flora vorhandene mehrfach-resistente colicinogene E. coli einen selektiven Vorteil erhalten, damit sie bei der anschließenden Subkultivierung auf den Tetracyclin-HCl resp. Chloramphenicol-haltigen Agarnährböden leichter zu erfassen sind. Um jedoch die Untersuchungen nicht einseitig durchzuführen, wurde zwischendurch die Methodik modifiziert. Es wurde dabei aber darauf geachtet, daß zu Beginn sowie am Ende des Versuches im Verfahren eine Übereinstimmung bestand, um die Möglichkeit des besseren Vergleichs der Ergebnisse zu haben. Um gegebenenfalls auch eine Aussage machen zu können, ob

Unterschiede in den Eigenschaften der Stämme bestehen, da am Anfang des Versuchs Antibiotika zur Durchfallprophylaxe in hoher Dosierung appliziert wurden und nachdem die Tiere zwölf Wochen ein Fütterungsantibiotikum in der vorgeschriebenen niedrigen Dosierung erhalten hatten, wurden bei der letzten Kotuntersuchung vor der Schlachtung zwei Verfahren gleichzeitig eingesetzt. Dadurch ist die Zahl der Stämme, die am Ende isoliert wurden, größer als die derjenigen, die zu Versuchsbeginn aus Kot gezüchtet worden sind. Dafür wurde jedoch ein Teil der Tiere noch ein zweites Mal untersucht, nämlich nachdem sie wie die anderen zur Durchfallprophylaxe das Präparat mit den drei verschiedenen Antibiotika erhalten hatten. Damit lag die Zahl der Stämme, die zu Beginn und am Ende des Versuchs sowohl auf Arzneimittelresistenz als auf Colicinogenie untersucht wurden ungefähr gleich, nämlich 136 bzw. 130 E. coli-Stämme. Diese Zahlen, und die der anderen Stämme, die bei dazwischenliegenden Untersuchungen isoliert worden sind, können der Tabelle 17 entnommen werden. Sie gibt zudem darüber Auskunft, von wieviel Tieren von den jeweils insgesamt untersuchten Kälbern zu den verschiedenen Zeitpunkten der Kotuntersuchung mit Tetracyclin-HCl oder Chloramphenicol als Selektivantibiotikum Stämme isoliert worden sind, die dann in die weiteren Untersuchungen einbezogen wurden. Insgesamt waren es von 321 entnommenen Kotproben 235, aus denen E. coli-Stämme mit den genannten Selektivantibiotika züchtbar waren.

Tab. 17 : Übersicht über die Anzahl der innerhalb der einzelnen Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuches isolierten E. coli-Stämme.

Tiergruppe	1. Woche*	2. Woche*	5. Woche**	10. Woche**	11. Woche**/*
Flavomycin = F (Anbindestall I)	20 (13)	-	20 (15)	12 (8)	22 (10)
Zinkbacitracin = Z ₁ (Anbindestall II)	32 (18)	-	13 (8)	9 (7)	32 (13)
Zinkbacitracin = Z ₂ (Laufstall, linke Hälfte)	17 (13)	23 (23)	8 (7)	9 (7)	39 (19)
Kontrolle (Laufstall, rechte Hälfte)	22 (18)	22 (22)	13 (10)	7 (5)	37 (19)
Σ der Stämme	91 (62)	45 (45)	54 (40)	37 (27)	130 (61)

Zahl der jeweils insgesamt untersuchten Tiere

82	45	40	74	80
----	----	----	----	----

* Isolierung nach Vorkultur in Selektivbouillon ** Isolierung im Direktverfahren

In () die jeweilige Zahl der Tiere, bei welchen die Anzucht auf Chloramphenicol und/oder tetracyclin-HCl -haltigem Agar gelungen war und von denen sie isoliert worden sind.

3.2.2.1 Ergebnisse der Prüfung auf Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden

Zur Feststellung inwieweit die Stämme aus diesem Material gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden, von denen R-Faktoren bekannt sind, mono- oder gar multiresistent sind, wurden über 500 Antibiogramme angesetzt und ausgewertet. Dabei wurden die Stämme einheitlich alle gegenüber den Konzentrationen der niederen Beladung (s. Methodik) getestet. Um eine Vergleichsmöglichkeit mit den Ergebnissen der Testung der Stämme aus dem Sektionsmaterial im Agardiffusionsverfahren zu haben, wurden die Stämme der letzten Untersuchung aus der Faecalflora vom Kalb auch gegenüber den Konzentrationen der hohen Beladung geprüft.

Bei Zugrundelegung der Testergebnisse, die im Agardiffusionsverfahren mit niederer Beladung der Testblättchen von den 136 am Anfang des Versuchs und 167 zu Versuchsende aus der Faecalflora von Kälbern isolierten *E. coli*-Stämmen erhalten worden sind, zeigte sich wie bei den Stämmen aus den inneren Organen an Colibacillose verendeter Kälber (s.Tab. 7) zu Versuchsbeginn eine hohe Resistenz gegenüber den Antibiotika Tetracyclin-HCl, Streptomycin, Chloramphenicol, Ampicillin, Kanamycin und dem stellvertretend für alle Sulfonamide getesteten Sulphafurazol. Nachdem jedoch die Tiere über mehrere Wochen (10 und mehr) kein Antibiotikum oder nur den Futterzusatzstoff (Zinkbacitracin oder Flavomycin) mit der Nahrung erhalten hatten, war ein Rückgang in der Zahl der Stämme mit Resistenz gegenüber einem oder mehreren Stoffen gleichzeitig zu verzeichnen. Aus einer Aufstellung in der Tabelle 18 geht hervor, daß insbesondere der Prozentsatz gegenüber Chloramphenicol, Ampicillin und Kanamycin resistenter Stämme im Vergleich zu den Ausgangswerten stark abgenommen hatte. Auch erwies sich kein Stamm mehr gegen-

über Colistin als resistent, nachdem sich anfänglich ein, wenn auch geringer, Prozentsatz von resistenten Stämmen feststellen ließ.

Bei einer Aufschlüsselung der Resistenzen unter Berücksichtigung der zu den verschiedenen Zeitpunkten der Kotuntersuchungen bei den einzelnen Stämmen nachgewiesenen Resistenzbilder fällt auf, daß nicht nur bestimmte, zu Beginn ermittelte Resistenzbilder seltener geworden waren, sondern auch die Häufigkeit der Resistenz gegenüber sechs und mehr Stoffen gleichzeitig zurückgegangen war. Die Zahl von Mehrfachresistenzen verschob sich allgemein nach unten, woraus ein gehäuftes Auftreten von Resistenzbildern mit Unempfindlichkeit gegenüber drei oder vier Stoffen gleichzeitig am Versuchsende resultierte. Nähere Einzelheiten darüber lassen sich den Tabellen 19 bis 22 entnehmen, in die gleichzeitig auch die Zahl der als colicinogen ermittelten Stämme aufgenommen wurde. Es sei dazu vermerkt, daß hier nur solche Stämme verzeichnet wurden, die nach vorheriger Kultivierung in Bouillon isoliert worden waren. Im Gegensatz zur Arzneimittelresistenz schien im Auftreten colicinogener Stämme bei Zugrundelegung des angenommenen prozentualen Anteils kein nennenswerter Unterschied zu bestehen.

Tab.18 : Unempfindlichkeit von E. coli-Stämmen, isoliert mit einem Selektivantibiotikum (Tetracyclinhydrochlorid oder Chloramphenicol) aus der Faecalflora von Kälbern, gegenüber acht verschiedenen Chemotherapeutika.
(Ergebnis der Antibiogramme mit niederer Beladung der Testblättchen)

Antibiotikum bzw. Sulfonamid in mcg/disc	Prozentualer Anteil der Stämme	
	a) zu Versuchs- beginn*	b) am Versuchs- ende**
Tetracyclin-HCl		
10	99,26	87,42
Streptomycin		
10	97,79	92,81
Chloramphenicol		
10	91,17	65,81
Ampicillin		
2	88,97	53,89
Kanamycin		
5	74,26	2,99
Colistin		
10	4,41	0
Gentamycin		
10	0	0
Sulphafurazol		
100	97,79	89,82
Anzahl der Stämme	136	167
Zahl der unter- suchten Proben	127	154

* 1. und 2. Woche der Milchaustauschfütterung

** 10. und 11. Woche der Milchaustauschfütterung

Tab.19 : Auftreten von Arzneimittelresistenz und Colicinogenie bei den zu verschiedenen Zeitpunkten des Fütterungsversuchs aus der Faecalflora, von, mit Flavomycin gefütterten, Kälbern, isolierten E. coli-Stämmen.

Zeitpunkt der Isolierung	1. Woche	2. Woche	5. Woche	11. Woche
Anzahl der Stämme mit Resistenz:	davon col [†] 20	davon col [†]	davon col [†] 20	davon col [†] 13
Verteilung auf folg. Resistenzbilder:				
TSCAKSU	20		11	
TSCASU	6		3	
CSAKSU			6	8
TSASU			5	2
TSSU			3	1
			2	1
				3

Tab. 20 : Auftreten von Arzneimittelresistenz und Colicinogenie bei den zu verschiedenen Zeitpunkten des Fütterungsversuchs aus der Faecalflora, von, mit Zinkbacitracin (Anbindestall) gefütterten, Kälbern, isolierten E. coli-Stämmen.

Zeitpunkt der Isolierung	1. Woche	2. Woche	5. Woche	11. Woche
Anzahl der Stämme mit Resistenz:	32 davon col	davon col	13 davon col	21 davon col
Verteilung auf folg. Resistenzbilder:				
TSCAKSU	22	6	9	10
TSCASU	6	2	3	1
TSGSU	1		1	3
TSASU	2			2
CSASU				1
TSC				1
TSSU	1			1
CSSU				1
TS				1
GSU				1

Tab. 21 : Auftreten von Arzneimittelresistenz und Colicinogenie bei den zu verschiedenen Zeitpunkten des Fütterungsversuchs aus der Faecalflora, von, mit Zinkbacitracin (Laufstall) gefütterten, Kalbern, isolierten E. coli-Stämmen.

Zeitpunkt der Isolierung	1. Woche	2. Woche	5. Woche	11. Woche
Anzahl der Stämme mit Resistenz:	17 davon col ⁺	23 davon col ⁺	8 davon col ⁺	22 davon col ⁺
Verteilung auf folg. Resistenzbilder				
TSCAKSUCT	1	5		1
TSCAKSU	4	18	6	3
TSCASU	2		1	1
TSCXSU	1			
TSCSU	1		1	3
TSASU	1			4
GSASU				2
TSSU	1			6
TASU	1			
CSSU	1			1
TS	2			
TA				1
TSU	1			
T	1			

Tab.22 : Auftreten von Arzneimittelresistenz und Colicinogenie bei den zu verschiedenen Zeitpunkten des Fütterungsversuchs aus der Faecalflora, von Kälbern aus der Kontrollgruppe, isolierten E. coli-Stämmen.

Zeitpunkt der Isolierung	1. Woche	2. Woche	5. Woche	11. Woche
Anzahl der Stämme mit Resistenz	davon col ⁺	davon col ⁺	davon col ⁺	davon col ⁺
22	22	22	13	16
Verteilung auf folg. Resistenzbilder				
TSCAKSU	8	22	8	
TSCASU	8		4	
TSCSU	4		3	7
TSASU	1		1	1
TSSU	1		1	1
TA				5
CSU				1

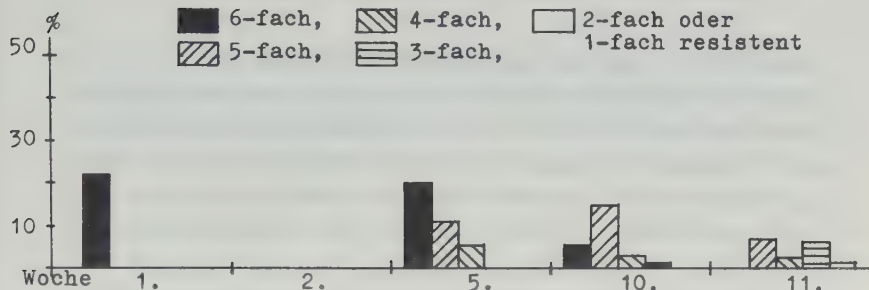
Bei einer vereinfachten Wiedergabe der Befunde sämtlicher Stämme, bei welcher die Resistenzbilder im einzelnen berücksichtigt blieben und nur die Zahl der Resistenzen gegenüber ein und mehr Stoffen gewertet wurde, in Form einer Graphik, läßt sich das Ergebnis der Verfolgungsuntersuchungen übersichtlicher zur Darstellung bringen (Abb. 5). Für das bessere Verständnis des Schaubildes sei vermerkt, daß die Zahl der zu den verschiedenen Zeitpunkten der Untersuchungen bewerteten Stämme gleich 100 % gesetzt wurden, so daß aus der Höhe der in die Abbildung 5 eingezeichneten Säulen die Anteile von Stämmen mit sechsfach und mehr, fünffach, vierfach, dreifach, zweifach und weniger Resistenzen daraus in Relation zueinander ablesbar werden. Das bedeutet mit anderen Worten, es läßt sich von dem Untersuchungsergebnis der ersten Wochen aus der graphischen Darstellung entnehmen, daß diejenigen Kälber, die noch keine Antibiotika mit der Tränke zur Durchfallprophylaxe erhalten hatten, neben Stämmen mit Resistenz gegen sechs und mehr Verbindungen auch noch solche aufwiesen mit einer Unempfindlichkeit gegenüber einer geringeren Anzahl von Stoffen. Nachdem auch diese das Präparat wie die beiden anderen Gruppen F (Flavomycin) und Z₁ (Zinkbacitracin, Anbindestall) erhalten hatten, dominierten bei ihnen ebenso die Stämme mit der höheren Zahl von Resistenzen gegenüber mehreren Stoffen (näml. sechs und mehr). Stämme mit vierfach und darunterliegender Resistenz waren nicht mehr nachweisbar. Daraus läßt sich zugleich ableiten, daß das Kombinationspräparat derart selektiv wirkt, daß innerhalb der Faecalflora von Kälbern derartige Stämme mit Mehrfachresistenz die Oberhand gewinnen konnten. Eine Tatsache verdient dabei besonders hervorgehoben zu werden, nämlich daß das Auftreten von Stämmen mit Unempfindlichkeit gegenüber einer großen Zahl von Stoffen stets die Resistenz gegenüber Chloramphenicol mit einschloß. Da aber das

Präparat kein Chloramphenicol, sondern lediglich außer Penicillin, Chlortetracyclin und Streptomycin in hoher Dosierung enthält, zeigt dieses Beispiel abermals, daß bei Vorliegen von Mehrfachresistenz ein Stoff genügt, um die Unempfindlichkeit gegenüber einem anderen mit zu selektieren.

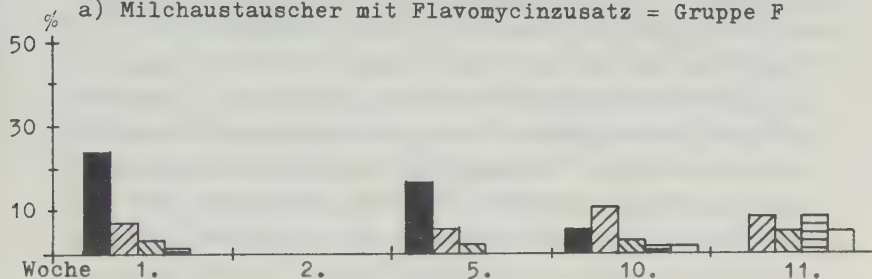
Die Untersuchungsergebnisse zeigen aber auch, daß ein Rückgang zu verzeichnen ist, wenn Stoffe in geringer Dosierung und ohne selektive Wirkung beim Tier Anwendung finden, wie im vorliegenden Fall der Verabreichung von Zinkbacitracin oder Flavomycin. Da auch bei der antibiotikumfrei ernährten Kontrolle gegen Versuchsende keine Stämme mit Resistenz gegenüber sechs und mehr Stoffen nachweisbar waren, muß zunächst offen bleiben, ob die verabreichten Stoffe zur R-Faktor-Eliminierung beigetragen haben, oder ob allein dem Fehlen eines antibakteriell wirksamen Stoffes, welcher die Übertragung extrachromosomaler Gene stimuliert, der Rückgang von Stämmen mit multipler, R-Faktor-abhängiger Resistenz zu verdanken ist. Das Auftreten von sechsfach resistenten Stämmen in der Gruppe Z_2 (Zinkbacitracin) auch noch zu Versuchsende ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß an Tiere dieser Gruppe wegen Erkrankungen mit Fieber (s.Tab. 5) in der achten bis zehnten Woche noch kurz vorher Antibiotika in therapeutischer Dosierung gegeben worden sind.

jeweiliger prozentualer Anteil der Stämme:

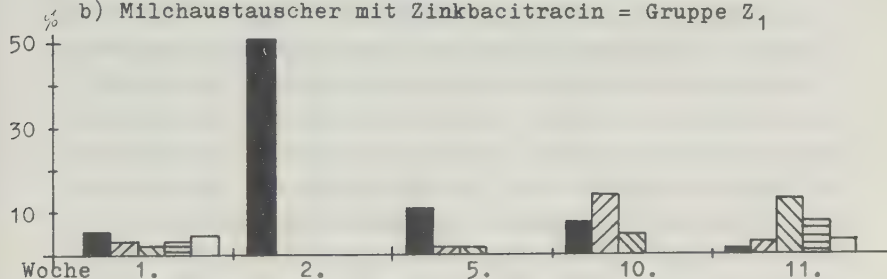
6-fach, 4-fach, 2-fach oder
 5-fach, 3-fach, 1-fach resistent



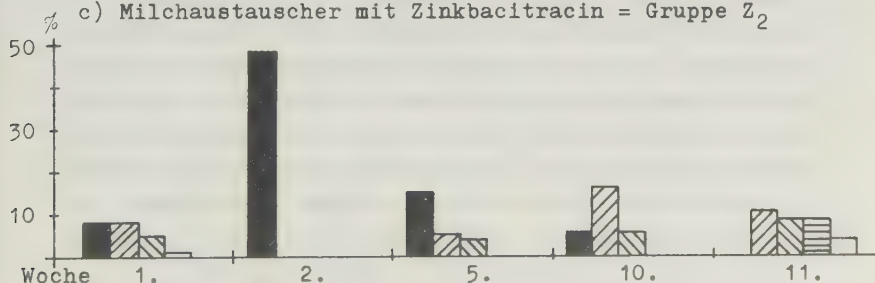
a) Milchaustauscher mit Flavomycinzusatz = Gruppe F



b) Milchaustauscher mit Zinkbacitracin = Gruppe Z₁



c) Milchaustauscher mit Zinkbacitracin = Gruppe Z₂



d) Milchaustauscher ohne Antibiotikazusatz = Gruppe K

Abb. 5: Vorkommen arzneimittelresistenter E. coli in der Faecalflora von Kälbern zu verschiedenen Zeitpunkten des Fütterungsversuchs

Bei einer Zugrundelegung des Testergebnisses des Agardiffusionsverfahrens mit hoher Beladung der Testblättchen erwies sich jedoch am Versuchsende überhaupt kein Stamm mehr als sechsfach und mehr arzneimittelresistent. Solche Stämme waren aber vom Kalb aus Sektionsmaterial isoliert worden. Bei einem Vergleich der Befunde unter Berücksichtigung der bei den verschiedenen Stämmen nachgewiesenen Resistenzbilder fällt auf, daß zwar noch ungefähr 30 % der Stämme aus der Faecalflora die en bloc übertragbare Resistenz gegenüber den drei Standardantibiotika Tetracyclin, Streptomycin und Chloramphenicol bei gleichzeitiger Unempfindlichkeit gegenüber Sulfonamiden in hoher Dosierung aufwiesen. Unter den Stämmen aus Sektionsmaterial waren es jedoch 72 %, die gleichzeitig auch zu einem größeren Prozentsatz als die resistenten aus der Faecalflora colicinogene Eigenschaften zeigten. 62,5 % dieser Stämme mit Resistenz gegenüber höheren Konzentrationen von Chemotherapeutika aus Sektionsmaterial hatten sich positiv im Colicintest erwiesen. Nur auf 29 % der Stämme aus der Faecalflora traf dies ebenfalls zu. Sie waren dabei auch weitaus häufiger resistent gegenüber Streptomycin, als gegenüber Chloramphenicol, und die Zahl von Stämmen mit dementsprechenden Resistenzbildern (s.Tab. 19 bis 22) größer. Bestimmte Merkmalskombinationen wie z.B. das Resistenzbild TSSU waren wie bei den Stämmen von Ferkeln aus Sektionsmaterial, die sich auch häufiger Streptomycin- als Chloramphenicol-resistent erwiesen hatten, auffällig oft nachweisbar. Resistenzbilder mit T, S und SU dominierten auch meist bei den Untersuchungen anderer Autoren (z.B. LEBEK, H.W. SMITH, STEPHAN u. BULLING, GEDEK).

Die Befunde dürften als Hinweis zu werten sein, welchen Einfluß die Antibiotikaaanwendung in der Therapie im Vergleich zu Fütterungszwecken auf die Merkmalsbildung und Resistenz bei Bakterien hat, denn die ver-

endeten Tiere dürften im Gegensatz zu den im Fütterungsversuch stehenden Kälbern noch vor ihrem Tod mit hohen therapeutischen Antibiotikadosen behandelt worden sein, womit dieser Unterschied in den Merkmalen der unter verschiedenen Voraussetzungen isolierten Stämme eine Erklärung finden kann.

3.2.2.2 Ergebnisse der Prüfung auf Colicinogenie

337 der zu verschiedenen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen Verfahren aus der Faecalflora von im Fütterungsversuch stehenden Kälbern isolierten *E. coli*-Stämme wurden mit den von FREDERICQ zur Verfügung stehenden Indikatorstämmen (s. Methodik) mit der Methode nach GEDEK und WEINMANN (1971) auf colicinogene Eigenschaften geprüft und wie bei den Stämmen aus Sektionsmaterial auch die Colicintypen bestimmt.

Von diesen 337 erwiesen sich 98 Stämme als colicinogen. Bei welchen Stämmen mit den verschiedenen Resistenzbildern in den einzelnen Gruppen F, Z₁ und K bei den fünf Kotuntersuchungen eine Colicinogenie nachgewiesen wurde, geht aus den Zahlen hervor, die neben der Anzahl der Stämme mit gleichem Resistenzbild in den Tabellen 19 bis 22 vermerkt sind. Es waren über ein Viertel der Stämme, nämlich 29,08 %, die über colicinogene Eigenschaften verfügten. Bei einer Gegenüberstellung der Zahlen der während der ersten fünf Wochen aufgetretenen und nach weiteren fünf bis sechs Wochen des Fütterungsversuchs insgesamt festgestellten colicinogenen Stämme zeigte sich keine große Differenz; ihr Prozentsatz betrug anfänglich 31,05 % gegenüber 26,53 % am Versuchsende.

Dennoch ergaben sich in anderer Hinsicht Unterschiede, auf die jedoch erst später näher eingegangen werden soll. Sie waren nicht nur von der Art des zur Isolierung arzneimittelresistenter Stämme angewandten Verfahrens abhängig, sondern standen womöglich mit der Vermeidung eines exzessiven Gebrauchs von Antibiotika während der Verabfolgung der zu prüfenden, heute vornehmlich an Stelle von Chlortetracyclin zu Futterungszwecken verwendeten Antibiotika Flavomycin und Zinkbacitracin in einem Zusammenhang.

Verglichen mit dem Anteil, den die colicinogenen Stämme bei den E. coli-Stämmen aus Sektionsmaterial ausgemacht hatten, nämlich 44,66 %, lag dieser im Falle der Kälber des Futterungsversuches erheblich darunter, obwohl bei diesen Tieren zu Anfang zur Durchfallprophylaxe Antibiotika in therapeutischer Dosierung verabfolgt worden waren, und die Mehrzahl der danach isolierten Stämme sechsfach resistent war wie die Stämme vom Kalb aus Sektionsmaterial. Bei einer Aufschlüsselung des Materials nach den zwei Tierarten, von denen die colicinogenen Stämme letztlich isoliert worden waren, lag der Anteil der colicinbildenden Stämme aus den inneren Organen von Kälbern im Vergleich zu den Ergebnissen der Faecalflorauntersuchung doppelt so hoch. Der Anteil der aus den an Colibacillose verendeten Ferkeln gezüchteten E. coli-Stämme mit colicinogenen Eigenschaften entsprach prozentual ungefähr jenen aus der Faecalflora des Kalbes.

Wie beim Sektionsmaterial dominierten aus den Stämmen der Faecalflora bestimmte Colicintypen. Mit etwa 93 % wurde Typ C wiederum am häufigsten ermittelt, gefolgt von S 1 und D. Daneben wurden Colicine vom Typ V, sowie B und aus der Gruppe E vor allem F und S 3 nachgewiesen. Andere Colicine wie I, G und H wurden nur vereinzelt, die Colicine A, J und K + X überhaupt nicht

festgestellt. Damit waren trotz der größeren Zahl, die von diesem Material zur Untersuchung gelangten, auch alle jene Colicine nachweisbar, die Stämme des Sektionsmaterials vom Kalb aufgewiesen hatten. Zwar dominierten auch hier die Colicine vom Typ C, D und S 1, bei der Gruppe E war aber vor allem E gegenüber F hervorgetreten und gleichzeitig ein höherer Anteil der selbstübertragbaren Colicine V und B als bei den Stämmen der Faecalflora nachgewiesen worden (vgl. Tab. 23). Durch die geringere Vielfalt der, bei den colicinogenen Stämmen von *E. coli* aus der Faecalflora, feststellbaren Colicine ergaben sich für diese auch allgemein nicht so hohe Zahlen in der Bildung von Colicinen durch den gleichen Stamm (s. Tab. 24). Maximal wurden durch einen Stamm elf verschiedene Colicine produziert. Die Mehrzahl der Stämme bildete zwei bis vier verschiedene Colicine.

Die verschiedenen Muster in der Colicinbildung, die im einzelnen festgestellt wurden, enthalten die Tabellen 25 und 26. Bei der Wiedergabe dieser Muster wurde auch dem Ergebnis des Agardiffusionsverfahrens Rechnung getragen, und der Vermerk so vorgenommen, daß aus der Tabelle gleichzeitig abzulesen ist, gegenüber wievielen der geprüften Verbindungen in niedrigerer Konzentration (s. Methodik: niedere Beladung der Testblättchen) der Stamm sich resistent verhalten hatte. Dabei wurde auch berücksichtigt, von welcher Gruppe des Fütterungsversuchs der Stamm aus der Faecalflora isoliert worden war.

Tab.23 : Häufigkeit des Nachweises der einzelnen Colicine bei E. coli-Stämmen aus der Faecalflora von Kälbern mit Berücksichtigung des Vorkommens in den verschiedenen Tiergruppen.

Colicine	Symbol	F	Anzahl der Stämme		K	Σ
			Z ₁	Z ₂		
V + M	1	9	19	9	10	47
B + M	2	7	18	8	9	42
D	3	14	17	16	16	63
A	4	-	-	-	-	0
E + I	5	6	6	7	15	34
F	6	11	18	8	10	47
G	7	-	-	-	1	1
I	8	-	3	-	2	5
C	9	21	21	22	27	91
H	0	-	-	-	1	1
J + I	A	-	-	-	-	0
K + X	B	-	-	-	-	0
S 1	I	18	15	19	18	60
S 3 + I	II	9	15	8	8	40
S 5	III	5	5	2	4	16
S 4	IV	3	6	3	5	17
insgesamt colicin- bildende Stämme		22	24	24	28	98

Anmerkung:

F = Gruppe mit Flavomycin

Z₁ = " mit Zinkbacitracin (Anbindestall)

Z₂ = " mit Zinkbacitracin (Laufstall)

K = " ohne Antibiotikum = Kontrolle

Tab.24 : Häufigkeit der Bildung von ein oder mehreren Colicinen bei den einzelnen colicinogenen Escherichia coli-Stämmen aus der Faecalflora vom Kalb.

Anzahl der gebildeten Colicine	Zahl der Stämme von	den Gruppen			Σ
	F	Z ₁	Z ₂	K	
1	-	1	2	3	6
2	4	1	5	5	15
3	6	3	2	6	17
4	4	2	7	5	16
5	1	2	1	1	5
6	2	4	1	-	7
7	1	6	3	3	13
8	1	1	3	1	6
9	2	1	-	1	4
10	1	2	-	1	4
11	-	1	-	2	3
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung:

F = Gruppe Flavomycin (Anbindestall)
 Z₁ = " Zinkbacitracin (Anbindestall)
 Z₂ = " " (Laufstall)
 K = Kontrollgruppe (Laufstall)

Den Tabellen 25 und 26 ist der wiederholte Nachweis des gleichen Colicinmusters zu entnehmen. Es ergaben sich dabei jedoch nur selten auch gleichzeitige Übereinstimmungen in der Zahl der Resistenzen gegenüber ein oder mehreren Stoffen. Häufiger waren, wenn auch mit Abweichung in der Resistenz, bestimmte Colicinmuster bei Stämmen, die von Tieren isoliert worden waren, die zwar nicht alle Zinkbacitracin als Futterzusatzstoff (Gruppe Z_2) mit dem Milchaustauscher erhalten hatten, die aber gemeinsam mit den Kontrolltieren (Gruppe K) in einem Stall (Laufstall) gehalten worden waren (Tab. 26). Bei den Tieren der anderen beiden Gruppen (F und Z_1), die streng getrennt voneinander untergebracht waren, ergab sich ein davon abweichendes Bild (Tab. 25). Gleiche Colicinmuster traten bevorzugt nur bei Stämmen ein und derselben Gruppe auf. Unterschiede, in Abhängigkeit vom Standort, waren auch in einer Häufung der Multiresistenzen zu verzeichnen (vgl. Tab. 25 und 26). Die Streuung in den Merkmalen war größer bei Stämmen der Gruppen des Laufstalls, wovon die eine Gruppe (K) antibiotikumfrei ernährt worden war, gegenüber den anderen beiden Gruppen (F und Z_1), von denen die eine Flavomycin, die andere Zinkbacitracin im Anbindestall mit der Nahrung erhalten hatten. Es ist danach anzunehmen, daß das jeweilige Milieu seinen Einfluß auf das Vorkommen von Stämmen mit bestimmten Eigenschaften geltend machen konnte.

Dieses Kapitel abschließend sei noch angeführt, daß eine hohe Mehrfachresistenz bei colicinogenen Stämmen aus der Faecalflora vom Kalb nicht häufiger war, als bei nicht colicinogenen Stämmen gleicher Herkunft (s. Tab. 27). Bei den Stämmen aus Sektionsmaterial hatte sich ein davon abweichendes Bild gezeigt, worauf schon einmal an anderer Stelle eingegangen wurde (vgl. Tab. 27).

Tab.25 : Verteilung der Merkmale von Arzneimittelresistenz und Colicinbildung bei den 46 colicinogenen E. coli-Stämmen aus der Faecalflora von Kälbern aus den Gruppen Flavomycin F (o) und Zinkbacitracin Z₁ (x).

Colicin-muster*	Gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden nach dem Antibiogramm mit niederer Beladung					
	7-,	6-,	5-,	4-,	3-,	2-, 1-fach resistent
9				x		
9/I			oo			o
18					x	
39			o			
39/I	ooo		o		o	
59/I	x					
69/I	x		o			
129				x		
69/II/III	o					
169/I	o					
359/I	o		ox			
359/IV	x					
1369/I			o			
12369						x
12689	x					
126/I/II/III	x		o			
1236/I/II					o	
12369/II			xx		x	
12369/I/II	xx		xx			
123569/II	o					
123569/I/II	o					
12369/I/II/IV				x		
12369/I/II/III/IV	o		x			
12569/I/II/III/IV						o
123569/I/II/III/IV	xx		o			
1235689/I/II/III/IV	x					

* Erklärung für die gewählten Symbole s.S. 42

Tab.26 : Verteilung der Merkmale von Arzneimittelresistenz und Colicinbildung bei den 52 colicinogenen E. coli-Stämmen der Faecalflora von Kälbern aus der Kontrollgruppe K (o) und der Gruppe Zinkbacitracin Z₂ (x).

Colicin-muster*	Gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden nach dem Antibiogramm mit niederer Beladung					
	7-,	6-,	5-,	4-,	3-,	2-, 1-fach resistent
1						o
3					x	
9		x	oo			
9/I	x		o	oox	x	x
39		x				
59		o		o		
39/I		o		x		
59/I		o	oo			
69/I			o			
359		x		o		
359/I		oo	o	xx	ox	x
369/I				x		
1239						ox
9/I/II/III				x		
12369		o				
126/I/II				x		
1239/I/IV		x				
3569/I/II/III		o				
12369/I/II		ox	x		x	
12369/II/IV		o				
1369/I/II/III/IV				x		
12569/I/II/IV	x					
123569/I/II		o			x	
123690/I/II/IV				o		
123569/I/II/III/IV		o				
1235689/I/II/III/IV					o	
12356789/II/III/IV		o				

Tab.27 : Vergleich der prozentualen Verteilung der Merkmale Arzneimittelresistenz und Colicininogenie bei den E. coli-Stämmen unterschiedlicher Herkunft.

Resistenz gegen- über Antibiotika u. Sulfonamiden	1. Stämme aus Sektionsmaterial		2. Stämme aus Faeces v. Kalb	
	col ⁺ %	col ⁻ %	col ⁺ %	col ⁻ %
6-fach u. darüber	6,79	11,65	11,28	29,67
5-fach	12,62	10,67	8,01	14,24
4-fach	8,73	7,76	5,34	13,05
3-fach	6,79	5,82	2,37	9,79
2-fach	5,82	6,79	1,18	2,67
1-fach	3,88	10,67	0,59	1,18
sensibel	-	1,94	-	0,29
Σ	44,66	55,33	29,08	70,91

Anmerkung:

col⁺ = colicininogen

col⁻ = nicht colicininogen

3.2.2.3 Einfluß des Verfahrens auf die Isolierung antibiotikaresistenter, colicinogener *E. coli*

Da bei der Untersuchung der Faecalflora von Kälbern zu den verschiedenen Zeitpunkten des Fütterungsversuchs nicht nur verschiedene Verfahren zur Erfassung der Stämme, die sich durch Arzneimittelresistenz und Colicinogenie auszeichnen, Anwendung fanden, sondern beide Verfahren auch nebeneinander bei der Aufarbeitung des gleichen Probenmaterials eingesetzt wurden, ist ein echter Vergleich möglich.

Bei der Vorschaltung einer Anreicherung in Bouillon wird offensichtlich den mehrfach antibiotikaresistenten Stämmen Gelegenheit gegeben, stärker hervorzutreten, wie aus Tabelle 28 hervorgeht. Dagegen erwiesen sie sich im Vergleich zu den direkt verimpften Kotsuspensionen als geringer colicinogen. 19,44 % der nach Anreicherung isolierten Stämme waren außer zweibis sechsfach antibiotikaresistent colicinogen. Von den im Direktverfahren isolierten ein- bis fünffach resistenten *E. coli*-Stämme waren es dagegen 36,84 %, also fast doppelt soviel. Da die Stämme aus Sektionsmaterial auch direkt isoliert worden sind, kann der bei ihnen größere Prozentsatz colicinogener Stämme gegebenenfalls auch auf das Verfahren zurückgeführt werden. Allerdings hatten sich diese Stämme auch gleichzeitig häufiger als vier- bis sechsfach resistent gegenüber Chemotherapeutika gezeigt. Eine Feststellung, die bei den Stämmen aus der Faecalflora bei Anwendung des Direktverfahrens nicht getroffen werden konnte (s.Tab. 28). Ohne Einfluß auf das Züchtungsergebnis war dagegen das verwendete Selektivantibiotikum. Bei einer Zusammenfassung sämtlicher Ergebnisse von der Anwendung der beiden verschiedenen Verfahren der Anzüchtung ergaben sich voneinander

abweichende Prozentsätze bei den colicinogenen und nichtcolicinogenen Stämmen hinsichtlich der bei ihnen nachgewiesenen Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, die in einer weiteren Tabelle (Tab. 29) aufgeführt sind.

Auch aus dieser Tabelle geht wiederum der höhere Prozentsatz colicinogener Stämme im Vergleich zu den nichtcolicinogenen hervor, wenn Kotsuspensionen direkt verimpft wurden. Jeweils etwa die Hälfte der Stämme hatte sich nach der Vorkultur in Bouillon unabhängig von der Fähigkeit Colicine zu bilden als sechsfach und mehr arzneimittelresistent erwiesen. Bei der direkten Verimpfung waren es insgesamt nur etwa ein Viertel der Stämme, die sich derart arzneimittelresistent gezeigt hatten.

Dies bestätigt abermals die Tatsache, daß wenn den Keimen Gelegenheit gegeben wird, vor der Erfassung ihrer Merkmale mit anderen zu konjugieren, das Testergebnis anders ausfällt, und es erklärt, weshalb die Ergebnisse hinsichtlich der Quote mehrfach resistenter *E. coli* sich bei den einzelnen Untersuchern (LEBEK, 1969 u. 1970; STEPHAN u. BULLING, 1971; GEDEK, 1972; u.a.) nicht immer in Übereinstimmung befanden. Bei Berücksichtigung der Relationen jedoch in der Zahl der Resistenzen gegenüber den geprüften Stoffen ergab sich bei colicinogenen und nichtcolicinogenen Stämmen kein signifikanter Unterschied. Unabhängig vom Verfahren war innerhalb der beiden Gruppen von Stämmen, die auf voneinander abweichende Weise aber unter Verwendung gleicher Selektivantibiotika angezüchtet worden waren, jeweils ein gleich hoher Anteil von Stämmen mit ein- bis sechsfacher Resistenz (und darüber) isoliert worden. Der geringere Prozentsatz colicinogener Stämme bei Vorkultur in Bouillon ist möglicherweise so zu werten, daß unter diesen Bedingungen sich Stämme mit Resistenz gegenüber Colicinen gegenüber Colicinbildnern

durchsetzen konnten, was gegebenenfalls auf einer größeren Bereitschaft nichtcolicinogener Stämme zur Konjugation beruhen könnte.

Bei dieser Gegenüberstellung der Ergebnisse der verschiedenen Anzuchtverfahren zeigt sich, daß unabhängig vom Vorhandensein colicinogener Eigenschaften bei einem Stamm mit der Vorkultur in Bouillon vor allem Stämme mit Resistenz gegenüber sechs und mehr Stoffen gleichzeitig zu erfassen waren. Damit kommt diesem Verfahren im Hinblick auf die Feststellung, ob nach Vermeidung des Gebrauchs von Antibiotika oder Sulfonamiden, die die R-Faktorübertragung stimulieren und für die Selektion R-Faktor-tragender Stämme innerhalb der Intestinalflora von Tieren verantwortlich sein sollen, ein Rückgang im Auftreten mehrfach arzneimittelresistenter Stämme zu verzeichnen ist, große Bedeutung zu. Eine Gegenüberstellung der colicinogenen Stämme mit Arzneimittelresistenz zeigt deutlich, daß die während der ersten Hälfte des Versuchs isolierten Stämme vornehmlich vier- bis siebenfach resistent waren; später erwiesen sie sich trotz der Möglichkeit während der Nacht in der Bouillon beliebig zu konjugieren gegenüber einer geringeren Zahl von Stoffen als resistent, nämlich mit einigen Ausnahmen vornehmlich nur fünf- und vierfach oder auch sogar monoresistent. Dabei fällt auf, daß gleichzeitig auch die Zahl der von den Stämmen gebildeten Colicine geringer war (s. Tab. 30 u. 34). Circa 70 % dieser Stämme bildeten höchstens vier Colicine gegenüber etwa 50 % der Stämme, die bei gleichzeitig geringerer Ansprechbarkeit auf Chemotherapeutika fünf bis elf Colicine produzierten.

Tab. 28: Vergleich des Auftretens von Arzneimittelresistenz und Colicinogenie, nach direkter Verimpfung bzw. nach vorheriger Anreicherung von, in der 11. Versuchswoche, aus der Faecalflora von Kälbern isolierten E. coli-Stämmen.

Art der Isolierung:	Anreicherung		dir. Verimpfung	
Anzahl der Stämme mit Resistenz:	72	davon col ⁺	57	davon col ⁺

Verteilung auf die Resistenzbilder:

TSCAKSU	1			
TSCASU	28	8	8	3
TSCKSU	1			
SCAKSU	1	1		
TSCSU	5	3	13	5
TSASU	9		7	3
SCASU	4		2	1
TSC	1		1	
TSSU	15	1	13	2
TCSU			1	
SCSU	2		3	3
TS	1		3	1
TA	2			
SSU			2	1
CSU	2	1		
T			1	
S			1	1
A			2	1

Tab.29 : Unterschiede im Nachweis von arzneimittelresistenten, colicinogenen und nicht colicinogenen E. coli-Stämmen bei der Züchtung aus der Faecalflora von Kälbern in Abhängigkeit vom Kulturverfahren.

Resistenz gegenüber Antibiotika u. Sulfonamiden	Isolierung der Stämme nach direkter Verimpfung der Kotsuspensionen		nach vorheriger Anreicherung in Bouillon	
	col ⁺ %	col ⁻ %	col ⁺ %	col ⁻ %
6-fach u. darüber	10,85	17,82	12,01	37,01
5-fach	10,07	11,62	6,73	15,86
4-fach	10,07	17,82	2,40	10,57
3-fach	3,87	9,30	1,44	9,61
2-fach	1,55	2,32	0,96	2,88
1-fach	1,55	2,32	-	0,48
Σ der Stämme	37,98	61,24	23,55	76,44

Anmerkung:

col⁺= colicinogen

col⁻= nicht colicinogen

Tab. 30: Zu verschiedenen Zeitpunkten des Fütterungsversuches bei colicinogenen E. coli-Stämmen aus der Faecalflora von Kälbern nachgewiesene Colicinbilder (Symbole s. S. 42) und Arzneimittelresistenz.

o = 1., 2. u. 5. Woche x = 10. u. 11. Woche

Colicinbild	Gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden nach dem Antibiogramm mit niederer Beladung					
	7-,	6-,	5-,	4-,	3-,	2-, 1-fach resistent
1						x
3					o	
9		o	oox			
9/I	o		oox	xxx	xx	x
18				x		
39		o	x			
59		o		o		
39/I		ooo	o	oox		
59/I		ox	ox			
69/I		o	ox			
129			x			
359		o		o		
9/I/II/III				x		
69/II/III		o				
169/I		o				
359/I		ooo	xxx	xx	ox	o
359/IV		o				
369/I				x		
1239						xx
126/I/II				o		
1369/I			o			
12369		o				x
12689		o				
126/I/II/III		o	o			
1236/I/II				o		
1239/I/IV		o				
12369/II			xx	x		
3569/I/II/III		o				
12369/I/II		ooo	xxx		x	
12369/II/IV		o				
123569/II		o				
1369/I/II/III/IV				x		
12569/I/II/IV	o					
12369/I/II/IV			x			
123569/I/II		oo			x	
12369/I/II/III/IV		o	o			
12569/I/II/III/IV				o		
123690/I/II/IV				o		
123569/I/II/III/IV		ooo	o			
1235689/I/II/III/IV		o			x	
12356789/II/III/IV		o				

3.2.2.4 Ergebnisse der Prüfung colicinogener Stämme im MHK - Test gegenüber Standardantibiotika

Von den 28 Stämmen, die in der ersten Woche des Versuches, sowie von 13 Stämmen, die in der elften Woche der Milchaustauschfütterung nach Vorkultur der Faeces aller im Fütterungsversuch stehender Kälber in Bouillon als Colicinbildner ermittelt worden waren, wurde die minimale Hemmkonzentration gegenüber den drei Standardantibiotika Tetracyclin-HCl, Streptomycin und Chloramphenicol bestimmt. Die Ergebnisse dieser Prüfung sind zusammen mit den Resultaten des Colicintests und der Bestimmung des Antibiotogramms im Agardiffusionsverfahren mit niedriger Beladung der Testblättchen in den Tabellen 31 und 32 enthalten.

Allgemein weniger als die Stämme aus Sektionsmaterial erwiesen sich diese gegenüber den hohen Konzentrationen aller drei Antibiotika als resistent (s. Abb. 6 u. 7). Bereits bei den zu Beginn des Versuchs isolierten Stämmen war die Resistenz gegenüber 128 bzw. 256 mcg/ml und darüber Tetracyclin-HCl, Streptomycin oder Chloramphenicol nicht sehr häufig. Eine Abnahme in der Höhe der Resistenz gegenüber den einzelnen Stoffen bei einem Vergleich zwischen den am Anfang und am Ende des Versuchs isolierten Stämmen ergab sich wohl bei Tetracyclin-HCl und Streptomycin, nicht aber bei Chloramphenicol.

Tab.31 : Auftreten von Arzneimittelresistenz bei
28 colicinogenen E.coli-Stämmen aus der Faecal-
flora von Kälbern, isoliert in der 1. Woche der
Milchaustauschfütterung.

Grup- pe*	nachgewiesene Colicine**	Ergebnis der Prüfung im			
		a) Agardiffusions- verf., nied. Bel.	b) MHK - Test** T	S	C
Z ₂	3	SCSU	256 <	32	>256
K	9	TSCASU	256 <	32	>256
K	9/I	TSCASU	128	64	>256
K	59	TSASU	>256	>256	64
F	39/I	TSCAKSU	128	64	>256
F	39/I	TSCAKSU	256 <	32	>256
K	59/I	TSCAKSU	<	64	>256 >256
K	69/I	TSCASU	128	64	>256
Z ₁	69/I	TSCAKSU	256 <	32	>256
F	69/II/III	TSCAKSU	128	-	>256
F	169/I	TSCAKSU	128	256	>256
Z ₂	359/I	TS	128	128	64
Z ₂	359/I	TASU	-	-	64
K	359/I	TSCAKSU	<	64	- >256
F	359/I	TSCAKSU	128	128	>256
K	12369	TSCAKSU	128	64	>256
Z ₁	12689	TSCAKSU	256	128	>256
Z ₂	1239/I/IV	TSCAKSU	128	64	>256
K	3569/I/II/III	TSCAKSU	128	64	>256
K	12369/I/II	TSCAKSU	128 <	32	>256
Z ₁	12369/I/II	TSCAKSU	<	64	64 256
Z ₁	12369/I/II	TSCASU	128 <	32	>256
Z ₁	12369/I/II	TSCAKSU	128 <	32	>256
Z ₁	12369/I/II	TSCAKSU	128	256	>256
F	123569/II	TSCAKSU	256	64	>256
Z ₂	12569/I/II/IV	TSCAKSUUCT	128 <	32	>256
K	123690/I/II/IV	TSCSU	128 <	32	>256
Z ₁	123569/I/II/III/IV	TSCAKSU	128	128	>256

Tab.32 : Auftreten von Arzneimittelresistenz bei 13 colicinogenen E. coli-Stämmen aus der Faecalflora von Kälbern, isoliert in der 11. Woche der Milchaustauschfütterung.

Gruppe*	nachgewiesene Colicine**	Ergebnis der Prüfung im			
		a) Agardiffusions- verf., nied. Bel.	b) MHK - Test**		
			T	S	C
F	9/I	TSCASU	< 64	< 32	> 256
Z ₁	18	TSCSU	128	< 32	> 256
F	39	SCAKSU	< 64	64	> 256
F	69/I	TSCASU	128	64	> 256
Z ₁	129	TSCASU	128	-	> 256
Z ₂	359/I	TSCSU	128	< 32	> 256
K	359/I	TSSU	256	128	< 64
Z ₁	359/I	TSCASU	128	256	> 256
Z ₂	369/I	TSCSU	128	-	> 256
Z ₁	12369/II	TSCASU	128	< 32	> 256
Z ₁	12369/II	TSCASU	128	< 32	256
Z ₁	12369/I/II	TSCASU	128	< 32	> 256
Z ₂	12369/I/II	TSCASU	128	256	256

- * F = Gruppe Flavomycin (Anbindestall)
 Z₁ = " Zinkbacitracin (Anbindestall)
 Z₂ = " " (Laufstall)
 K = Kontrollgruppe (Laufstall)

** Erklärung für die gewählten Symbole s.S.42 und S.56

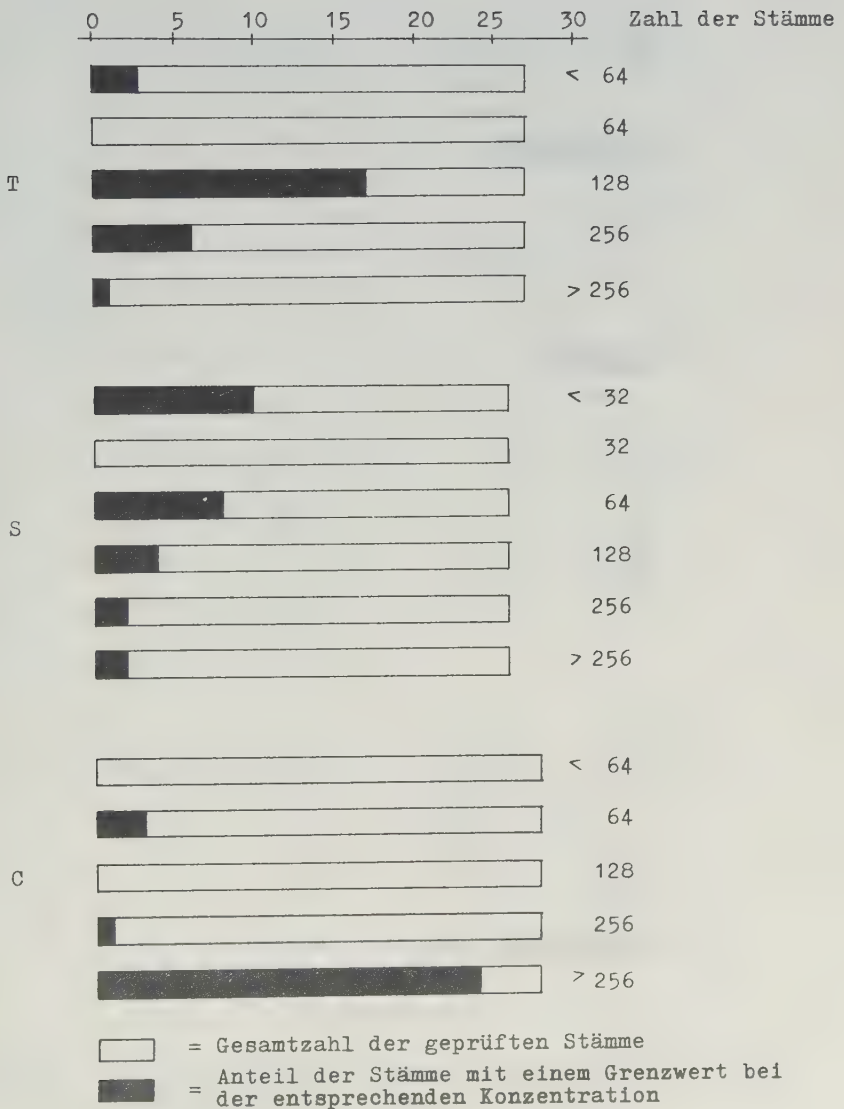
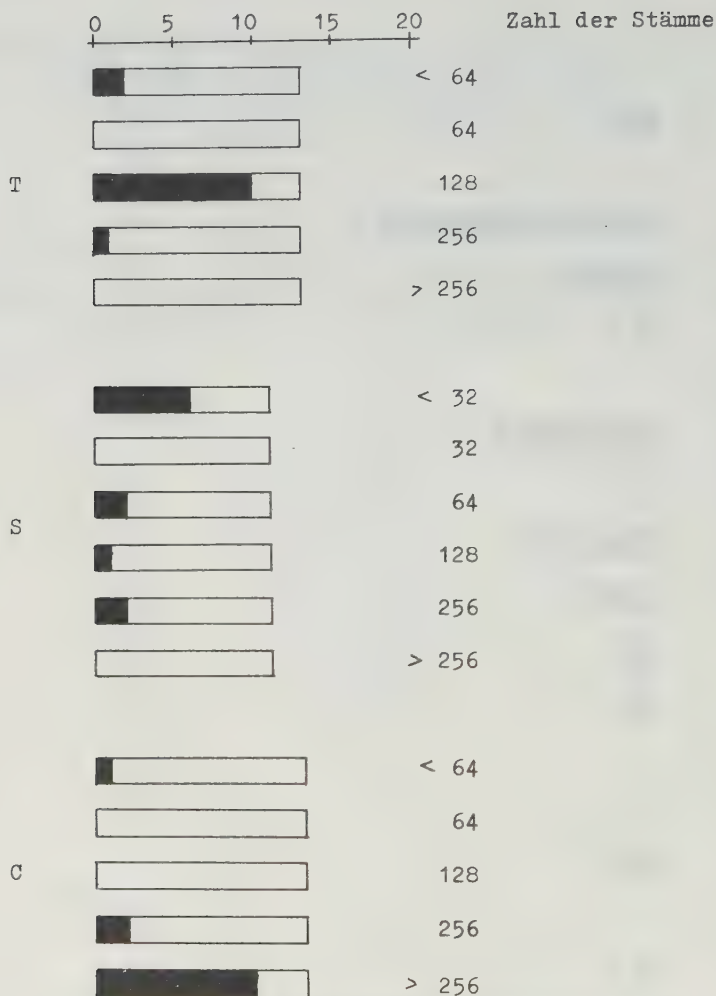


Abb. 6 : Empfindlichkeit von 28 colicinogenen zu Versuchsbeginn aus Faeces vom Kalb isolierten *E. coli*-Stämme gegenüber abgestuften Konzentrationen von Tetracyclin-HCl (T), Streptomycin (S) und Chloramphenicol (C) im MHK - Test in mcg/ml Mueller-Hinton-Broth, Difco.



Erklärung siehe Abbildung 6 .

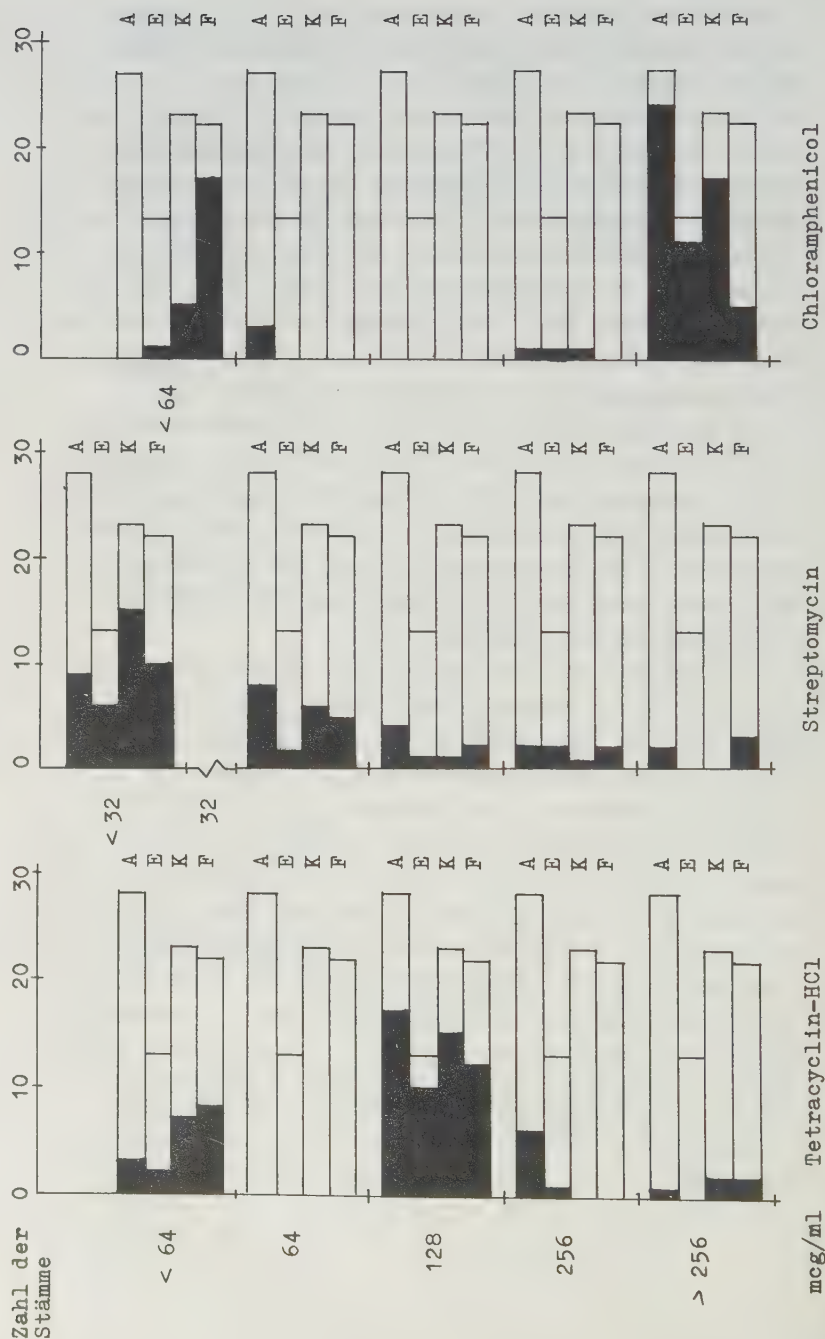
Abb. 7 : Empfindlichkeit von 13 colicinogenen am Versuchsende aus Faeces vom Kalb isolierten E. coli-Stämme gegenüber abgestuften Konzentrationen von Tetra-cyclin-HCl (T), Streptomycin (S) und Chloramphenicol (C) im MHK - Test in mcg/ml Mueller-Hinton-Broth, Difco.

Bei einem Vergleich der Befunde mit denen von den colicinogenen Stämmen aus Sektionsmaterial (Abb. 8) waren Stämme mit Unempfindlichkeit gegenüber mehr als 256 mcg/ml Tetracyclin-HCl nur beim Sektionsmaterial und am Anfang des Fütterungsversuches nach der Applikation von Antibiotika in hohen Dosen zur Durchfallprophylaxe nachweisbar. Hinsichtlich einer Unempfindlichkeit gegenüber 256 mcg/ml des gleichen Stoffes bestand ein Unterschied zwischen Anfang und Ende des Fütterungsversuches. Eine Häufung einer Unempfindlichkeit der Stämme gegenüber 128 mcg/ml Tetracyclin-HCl lag unabhängig von der Herkunft der Stämme vor.

Bei Streptomycin verteilten sich die MHK-Werte sehr auf die verschiedenen Möglichkeiten, und es ist neben der allgemeinen geringeren Ansprechbarkeit der Stämme vom Ferkel auf Streptomycin lediglich auffällig, daß am Ende des Fütterungsversuchs bei den Stämmen vom Kalb keine mehr mit Resistenzen gegenüber mehr als 256 mcg/ml nachweisbar waren.

Anders verhält es sich dagegen bei Chloramphenicol. Hier sprach die Mehrzahl der Stämme nicht einmal auf 256 mcg/ml an oder wurde nicht durch Mengen von 64 mcg/ml gehemmt. Ein kleiner Teil der Stämme vom Kalb aus Sektionsmaterial und aus der Flora erwies sich gegenüber 256 mcg/ml als empfindlich. Trotz Verabreichung von Antibiotika (Flavomycin und Zinkbacitracin) in fast ausschließlich nutritiver Dosierung war der Anteil von E. coli-Stämmen mit Unempfindlichkeit gegenüber mehr als 256 mcg/ml Chloramphenicol noch relativ hoch, und entsprach nicht dem Verhalten der Stämme vom Ferkel aus Sektionsmaterial, die sich allgemein auch weniger als die Stämme vom Kalb als Chloramphenicol-resistent erwiesen hatten.

Abb. 8 :Gegenüberstellung der Empfindlichkeit der colicinenen E. coli-Stämme aus dem unterschiedlichen Untersuchungsmaterial im MHK - Test.



3.2.2.5 Gegenüberstellung von Einzelbefunden der antibiotikresistenten, colicinogenen Stämme

In den vorangegangenen Kapiteln wurde bereits aufgezeigt, daß bei Züchtung mit Tetracyclin-HCl oder Chloramphenicol als Selektivantibiotikum von *E. coli*-Stämmen aus der Faecalflora von Kälbern, unabhängig davon, ob nach Vorkultur in Bouillon oder nach direkter Verimpfung auf Nährboden isoliert, auch noch nach mehrwöchiger Applikation von Flavomycin oder Zinkbacitracin als Futterzusatzstoffe *E. coli*-Stämme mit Resistenzeigenschaften nachweisbar waren, diese aber im Vergleich zu den Befunden zu Versuchsbeginn seltener gegenüber einer größeren Zahl von Stoffen gleichzeitig resistent waren. Prozentual waren auch kaum weniger colicinogene Stämme am Versuchsende aus der Faecalflora zum Nachweis gelangt. Im Durchschnitt wurden jedoch zu Beginn der Verfütterung der neuen Futterzusatzstoffe bei den colicinogenen Stämmen ein bis zwei Colicine mehr gebildet, als von den Stämmen am Versuchsende.

Bei Berücksichtigung auch jener Colicinmuster, die von den Stämmen des Sektionsmaterials feststellbar waren (s.Tab. 33), haben sich insgesamt 58 verschiedene Merkmalskombinationen ergeben, wobei nur vier relativ häufig, die anderen oftmals nur drei-, zwei- oder nur einmal aufgetreten waren. Manche Bilder waren überhaupt nur beim Kalb oder auch nur beim Ferkel angetroffen worden. Da die Colicintypen C, D, S 1 neben E, F, V und B beim Kalb verhältnismäßig zahlreich gebildet wurden, traten Kombinationen dieser Colicine gegenüber anderen Colicinbildern auch stärker hervor.

Bei den Stämmen aus der Faecalflora vom Kalb fällt eine größere Vielfalt an Mustern zu Beginn des Versuchs auf, später am Versuchsende war sie weitaus be-

scheidener, und Bilder mit einer geringeren Zahl von Colicinen waren häufiger als zuvor.

Aus einer Gegenüberstellung der Colicine, die von den Stämmen im einzelnen am Anfang und am Ende gebildet wurden, läßt sich entnehmen, daß vor allem die Colicine der Gruppe E nach elf Wochen langer Verfütterung von Flavomycin oder Zinkbacitracin nicht mehr so zahlreich wie zuvor feststellbar waren (Tab. 34). Allerdings waren auch die Colicine vom Typ V, B, D, S 1 und vor allem S 4 nicht mehr so häufig prozentual nachweisbar, aber die Gruppe E war signifikant geringer vertreten. Bei einer Aufschlüsselung nach den Versuchstiergruppen zeigt sich, daß vor allem weniger Colicine von den Stämmen der Gruppe F und K gebildet wurde. Da bei der Gruppe F mit Flavomycinfütterung neben C, D und S 1 Colicine vom Typ V, B, S 5 und S 4 überhaupt nicht mehr, und E, F nur vereinzelt nachweisbar waren, was dagegen für die antibiotikumfrei ernährte Kontrollgruppe nicht in gleichem Umfang zutraf, besteht die Möglichkeit, daß der Stoff nicht nur zur R-Faktor-Eliminierung, sondern auch zu einer solchen von Col-Faktoren beigetragen hat. Jedoch wäre dies durch zusätzliche Untersuchungen noch zu sichern.

Der bei der Kontrollgruppe vor allem geringere Nachweis von Colicinen der E-Gruppe zu Versuchsende dürfte darauf zurückzuführen sein, daß, wenn keine Stimulierung der R-Faktor-Übertragung durch Chemotherapeutika erfolgt, auch die nicht selbstübertragbaren Colicine innerhalb der Populationen eine geringere Verbreitung finden (vgl. hierzu Schrifttum S. 18).

Tab.33 : Übersicht über die Colicinbilder und deren Häufigkeit im Vorkommen bei arzneimittelresistenten E. coli-Stämmen aus Sektionsmaterial und aus der Faecalflora.

Zahl der Colicine	Colicinbild	Anzahl der Stämme				Σ
		F	K	A	E	
1	1				1	1
	3			1		1
	9	1	1	3	1	6
2	9/I		2	3	7	12
	18				1	1
	39		1	1	1	3
	59			2		2
3	29/I	1				1
	39/I	2	2	5	2	11
	59/I			2	2	4
	59/II	1				1
	69/I			2	1	3
	129				1	1
	359		3	2		5
4	9/I/II/III				1	1
	69/II/III			1		1
	169/I			1		1
	359/I	2	5	5	6	18
	359/IV			1		1
	369/I				1	1
	1239				2	2
5	69/I/II/III	1				1
	126/I/II			1		1
	169/II/III	1				1
	569/II/III	1				1
	1369/I			1		1
	12369			1	1	2
	12689			1		1
6	126/I/II/III			2		2
	169/I/II/III	3				3
	369/I/II/III	2	1			3
	569/I/II/III	1				1
	1236/I/II			1		1
	1239/I/IV			1		1
	12356/II		1			1
	12369/II		1		3	4

Fortsetzung Tab. 33

Zahl der Colicine	Colicinbild	F	K	A	E	Σ
7	1369/I/II/III	1				1
	1569/I/II/III	1	1			2
	3569/I/II/III			1		1
	12369/I/II	2		6	4	12
	12369/II/IV			1		1
	123569/II			1		1
8	1369/I/II/III/IV				1	1
	12369/I/II/IV		2		1	3
	12569/I/II/IV			1		1
	123569/I/II			2	1	3
	123689/I/II		1			1
9	12369/I/II/III/IV			2		2
	12569/I/II/III/IV			1		1
	123569/I/II/III	1				1
	123690/I/II/IV			1		1
	1235689/I/II	1				1
10	123569/I/II/III/IV			4		4
	1235689/I/II/III		1			1
11	126890AB/I/III/IV		1			1
	1235689/I/II/III/IV			1	1	2
	12356789/II/III/IV			1		1
13	12345679AB/II/III/IV		1			1

Zeichenerklärung:

F = Ferkel, Sektionsmaterial

K = Kalb, Sektionsmaterial

A = Kalb, Faecalflora, Anfang des Versuchs bis 5. Woche

E = Kalb, Faecalflora, Ende des Versuchs, 10. und 11. Woche

Tab.34 : Gegenüberstellung des Vorkommens der verschiedenen Colicine bei den zu Anfang* und am Ende** des Versuches aus der Faecalflora von Kälbern isolierten, colicinogenen E. coli-Stämme.

Colicine	Symbol	Nachweis bei Stämmen der Gruppen				Differenz zw. Anfang u. Ende in %
		F	Z ₁	Z ₂	K	
V + M	1	9/0	10/9	4/5	7/3	- 7,3
B + M	2	7/0	10/8	4/4	7/2	- 11,6
D	3	11/3	9/8	7/9	12/4	- 4,6
A	4	-	-	-	-	-
E + I	5	5/1	4/2	4/3	11/4	- 15,0
F	6	10/1	11/7	3/5	9/1	- 20,0
G	7	-	-	-	1/0	- 1,7
I	8	-	2/1	-	1/1	+ 0,1
C	9	15/6	11/10	9/13	19/8	+ 3,3
H	0	-	-	-	1/0	- 1,7
J + I	A	-	-	-	-	
K + X	B	-	-	-	-	
S 1	I	14/4	10/5	7/12	12/6	- 3,3
S 3 + I	II	8/1	9/6	3/5	7/1	- 12,4
S 5	III	5/0	5/0	0/2	3/1	- 14,3
S 4	IV	3/0	5/1	2/1	4/1	- 16,0
Anzahl der colicinogenen Stämme		16/6	13/11	11/13	19/9	- 4,5

Anmerkung:

* 1., 2. und 5. Woche

** 10. und 11. Woche

4. DISKUSSION

Im Vergleich zu erst wenige Jahre zurückliegenden Untersuchungsergebnissen ist das Vorkommen von *E. coli*-Stämmen im Untersuchungsmaterial von Tieren, welche sich nicht nur resistent gegenüber einem, sondern gleichzeitig gegenüber mehreren Chemotherapeutika zeigten, überraschend hoch. Noch Ende der 60er Jahre hatten sich die Mehrzahl der *E. coli*-Stämme landwirtschaftlicher Nutztiere nur als monoresistent gegenüber Tetracyclinen erwiesen (LEBEK, 1969; STEPHAN u. BULLING, 1971; GEDEK, 1972). Allerdings war GUINEE et al. (1972) schon damals eine Zunahme von *E. coli*-Stämmen mit Mehrfachresistenz, insbesondere beim Kalb aufgefallen, wobei sich die Stämme auch schon als chloramphenicolresistent erwiesen hatten, ohne daß an die Tiere dieses Antibiotikum verabreicht worden war. Es war dabei nicht bewertet worden, ob die Verwendung von Futterzusatzstoffen mit antibakterieller Wirkung dafür allein verantwortlich war. Die Befunde der vorliegenden Untersuchung dürften jedoch den eindeutigen Beweis dafür geliefert haben, daß die, für die Ausbreitung gegenüber mehreren Stoffen gleichzeitig resistenter Keime, erforderliche Selektion nur bei Applikation von Antibiotika oder Sulfonamiden in therapeutischer Dosierung stattfindet. Ihr ist der hohe Anteil weitgehend unempfindlicher Stämme auch in der Flora von Kälbern zuzuschreiben. Beim Ferkel, bei welchem Chemotherapeutika nicht mit gleicher Regelmäßigkeit und in meist geringerer Dosierung als beim Kalb angewendet werden, erwiesen sich die Stämme vor allem gegenüber hohen Konzentrationen von Streptomycin und Sulfonamiden als resistent. Bei den Stämmen vom Kalb aus Sektionsmaterial war ein hoher Prozentsatz auch resistent gegenüber Chloramphenicol. Sie traten mit Resistenz gegenüber Ampicillin und Kanamycin stärker in der Faecalflora der Kälber zu

Beginn des Fütterungsversuches hervor, nachdem ein Kombinationspräparat in hoher Dosierung verabreicht worden war. Da insbesondere Stämme mit Resistenz gegenüber diesen Stoffen, nachdem die Applikation von antibiotischen Stoffen nach Möglichkeit vermieden wurde und Reinfektionen bei der Art der Unterbringung der Tiere aus der Umwelt ausgeschlossen waren, innerhalb des mehrwöchigen Fütterungsversuches wieder verschwanden, wird deutlich, welche Bedeutung der Verabreichung von Antibiotika in therapeutischer Dosierung in Bezug auf die Selektion solcher Stämme zukommt (WATANABE, 1971; LEBEK, 1972b; u.a.). Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Forderung heute zu nutritiven Zwecken andere Stoffe als für die Therapie zu verwenden.

Der Rückgang, weniger in der Gesamtzahl resistenter Stämme als vielmehr jener Vertreter mit Resistenz gegenüber vier bis sieben Stoffen gleichzeitig, unter der Verabreichung von Zinkbacitracin oder Flavomycin und auch bei der antibiotikumfrei ernährten Kontrolle weist bereits darauf hin, - ohne daß dies näher untersucht worden wäre -, daß die Resistenz vorwiegend auf die weite Verbreitung von R-Faktoren in den Populationen zurückzuführen ist. Ein vermindertes Auftreten R-Faktor-tragender Stämme oder auch von Keimen mit weniger Resistenzdeterminanten kann die Folge davon sein, daß unter der Verabreichung der neuen Futteradditiva der in Gegenwart z.B. von Standardantibiotika zu verzeichnende, R-Faktorübertragung stimulierende Effekt ausblieb (FEDERIC et al., 1973). Es kann aber auch ein Verlust bestimmter R-Faktoren eingetreten sein (LEBEK, 1972b; BRANA et al., 1973), weil insbesondere eine geringere Resistenz gegenüber Chloramphenicol, Kanamycin und Ampicillin, weniger gegenüber Tetracyclinen, Streptomycin und Sulfonamiden festzustellen war, und die Resistenzgene ersterer Antibiotika leichter aus der Bakterienzelle eliminiert werden als die der

anderen (GEDEK, 1973). Für letzteren Vorgang spricht, daß neben der Abnahme der Zahl der Resistenzen gegenüber mehreren Stoffen gleichzeitig bei den E. coli-Stämmen auch die Anzahl der von einem colicinogenen Stamm gebildeten Colicintypen geringer war. Da aber unabhängig davon vor allem die nicht selbstübertragbaren Col-Faktoren bei den E. coli-Stämmen nach weitgehender Fernhaltung der Kälber von der Anwendung von Antibiotika und Sulfonamiden in therapeutischer Dosierung in vermindertem Umfang festzustellen waren, dürfte zudem auch noch ein Rückgang in den Übertragungsvorgängen das Ergebnis beeinflußt haben.

Findet neben dem Auftreten von Resistenz bei den E. coli-Stämmen aus der Faecalflora von Kälbern auch das gleichzeitige Vorhandensein von Colicinogenie Berücksichtigung, so zeigt sich, daß die Zahl der colicinbildenden Stämme wie die der resistenten kaum geringer war als zuvor, nämlich 26,53 % gegenüber 31,05 % zu Beginn der Untersuchung. Lediglich in der Zahl der Eigenschaften, über die ein einzelner Stamm verfügen kann, bestand bei den E. coli-Stämmen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Isolierung (Anfang oder Ende des Fütterungsversuches) eine deutliche Diskrepanz.

Die größte Vielfalt in den Merkmalen überhaupt ergab sich jedoch bei den E. coli-Stämmen vom Kalb, wenn sie aus Sektionsmaterial isoliert worden waren. Die hohen Resistenzgrade, die diese Stämme unter Zugrundelegung nicht nur des Antibiotogramms des Agar-diffusionsverfahrens, sondern auch des MHK-Tests gezeigt hatten, und die Zahl der von ihnen gleichzeitig gebildeten Colicine weisen darauf hin, daß diese Merkmale nur durch wiederholte Konjugationen erworben sein können. Hierbei dürfte der exzessive Gebrauch von Antibiotika, insbesondere beim Kalb, eine maßgebliche Rolle gespielt haben, und dabei sowohl R- als auch bestimmte Col-Faktoren als Fertilitätsfaktoren für

Merkmalsbildung gesorgt haben. Da aber allerdings mehrere Fertilitätsfaktoren nebeneinander zu wenig stabilen Formen führen (HEDGES u. DATTA, 1971; KATO et al., 1962), mag es sein, daß letztlich die *E. coli*-Stämme mit den selbstübertragbaren Col-Faktoren nicht dominierten. Bei Vorkultur der *E. coli* aus der Faecalflora vom Kalb in Bouillon waren multiresistente Stämme seltener colicinogen als nach direkter Verimpfung auf Nährboden, was darauf hindeutet, daß entweder bei Vorliegen von R-Faktoren eine Superinfektionsimmunität die Aufnahme von Col-Faktoren ausschloß oder bei gleichzeitiger Resistenz nicht nur gegenüber Chemotherapeutika, sondern auch gegenüber Colicinen, colicinogene Stämme diesen gegenüber nicht im Vorteil waren (SICCARDI, 1966). Da auch bei direkter Verimpfung die colicinogenen, arzneimittelresistenten Stämme unter 50 % betrugen, waren sie gegenüber den arzneimittel- und vermutlich auch colicinresistenten, nicht colicinogenen Stämmen von vornherein in der Minderzahl.

Bei Zugrundelegung der Anzahl arzneimittelresistenter *E. coli*-Stämme, die sich bei den Untersuchungen insgesamt als colicinogen erwiesen hatten, nähert sich der Wert jenem Prozentsatz, welcher von BRANDIS und SMARDA (1971) als Durchschnitt angenommen wird. Mit einer Quote von etwa einem Drittel entspricht er ungefähr jenen Prozentzahlen, die von SOKOL und FEDERIC (1974) zuletzt beim Schwein ermittelt worden sind. Bei der Berücksichtigung der Herkunft der Stämme mit colicinogenen Eigenschaften und des Zeitpunktes der Isolierung während des Fütterungsversuchs zeichnen sich jedoch Unterschiede ab, welchen möglicherweise sogar epidemiologische Bedeutung zukommt (HELLER u. SMITH, 1973; SZTUM - RUBINSTEIN et al., 1973).

Bei einer Gegenüberstellung der Zahl der colicinogenen Stämme aus Untersuchungsmaterial verendeter Tiere und denjenigen aus der Faecalflora von gesunden

Kälbern entsprach der Prozentsatz der von kranken Tieren isolierten, colicinogenen Stämme jenem, den HORAK und LANC (1973) bei an Harnwegsinfektion leidenden Menschen festgestellt hatten. Bei einer weiteren Aufschlüsselung der Befunde vom Sektionsmaterial konnte festgestellt werden, daß der Prozentsatz der E. coli-Stämme mit Arzneimittelresistenz und colicinogenen Eigenschaften von an Colibacilliose verwendeten Kälbern im Vergleich zu solchen Stämmen aus der Faecalflora von gesunden Kälbern doppelt so hoch war. Dies widerspricht teilweise den bisher über das Vorkommen colicinogener Stämme beim Tier vorliegenden Befunden, wonach häufiger bei gesunden als bei kranken Tieren colicinogene Stämme nachgewiesen worden waren (TROCKA u. WILLINGER, 1972; JAKOVINA, 1972; u.a.). Allerdings stellte VASENIUS (1966) auch bei Stämmen von kranken Ferkeln 60 % Colicinogenie fest. Bei den Untersuchungen fand jedoch kaum auch das gleichzeitige Auftreten von Resistenz gegenüber Chemotherapeutika Beachtung. Da sich zwischen colicinogenen Stämmen und nichtcolicinogenen Stämmen in Bezug auf das Vorhandensein von Resistenz gegenüber drei und mehr Verbindungen gleichzeitig keine nennenswerten Unterschiede in den prozentualen Anteilen ergaben, könnte es möglich sein, daß die Colicinogenie letztlich doch eine Eigenschaft ist, die weit häufiger bei sensiblen E. coli-Stämmen verbreitet ist. Immerhin scheint das Vorhandensein von R-Faktoren eine Exklusion von Col-Faktoren zu bewirken. Eine solche ist z.B. für den Colicintyp K + X beschrieben (KATO et al., 1962). Dieser Typ war auch bei keinem der 98 Stämme mit colicinogenen Eigenschaften aus der Faecalflora von Kälbern und nur bei zwei Stämmen aus Sektionsmaterial zum Nachweis gelangt. Bei der Vielfalt der ansonsten aufgetretenen Merkmalskombinationen wird jedoch eher der Eindruck erweckt, als ob sie die Merkmalsbildung

nur wenig beeinflusst hat. Da die selbstübertragbaren Colicine wie V, B und I b, selbst wenn einige des Typs E auch noch I a produziert haben sollten, gegenüber den anderen Colicintypen weniger häufig aufgetreten waren, als nach Untersuchungen von Stämmen des Menschen zu erwarten war, ist anzunehmen, daß anstelle Col-Faktoren R-Faktoren für die Weiterverbreitung sorgten. Bei einem Rückgang von R-Faktoren müssten sich danach ebenso die Col-Faktoren vermindern, wie dies auch bei den Stämmen der im Fütterungsversuch stehenden Kälber nachgewiesen werden konnte. Die mögliche Abhängigkeit der Col-Faktoren von R-Faktoren zeigte sich auch im vom Serotyp unabhängigen Vorkommen. Es ließ sich nicht bestätigen, daß manche Colicintypen von einem enteropathogenen Serotyp häufiger oder nur ausschließlich gebildet wurden (TRUSZYNSKI et al, 1969; BRANDIS u. SMARDA, 1971; HETTIARATCHY et al., 1973; HORAK u. LANC, 1973). Auch bestand keine Beziehung zum gleichzeitigen Auftreten des Hämolsinbildungsfaktors bei Stämmen des Sektionsmaterials (TRCKA u. WILLINGER, 1972).

Soweit bisher bei Untersuchungen von E. coli-Stämmen aus Colicinogenie überhaupt eine Bestimmung der durch die Stämme gebildeten Colicintypen vorgenommen wurde, befinden sich diese nur teilweise in Einklang mit den eigenen Ergebnissen (STROKOV, 1971; HORAK u. LANC, 1973). Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß Milieuverhältnisse hierauf einen Einfluß ausüben. Dies fiel bereits bei den eigenen Untersuchungen auf, wobei sich gewisse Unterschiede in den Colicinbildern ergeben hatten in Abhängigkeit davon, in welchem Stall die Tiere untergebracht waren.

Während von E. coli-Stämmen des Menschen nach bisherigen Untersuchungen vor allem die Bildung der Colicintypen V, I, D, E, G, H, B, A und K beschrieben worden ist (HORAK u. LANC, 1973; u.a.), wobei kaum

eine Notiz zu finden ist, daß mehrere gleichzeitig vom selben Stamm produziert wurden, verdienen diesen gegenüber als häufigste Typen vom Tier die Colicine C, S 1, F, S 3 + I, S 4 und S 5 neben V, B und E besonders herausgestellt zu werden.

Am häufigsten wurden von den Stämmen C und S 1 gebildet, die beide weitgehend enzymresistent sind. Von diesen beiden stellt jedoch das C nur ein schwaches Colicin dar, was aber in Bezug auf die eigene Spezies nur von untergeordneter Bedeutung sein soll, da von den Colicinen der *E. coli* eine Wirkung in erster Linie gegenüber artverwandten Spezies erwartet wird (BRANDIS u. SMARDA, 1971). Unter diesem Aspekt gesehen, ist außer von C gegenüber Salmonellen auch ein Effekt von den relativ häufig nachgewiesenen Colicinen D, E 1 und E 2 (= S 3 + I und S 5) sowie B und V denkbar, sie gelten jedoch als proteasenempfindlich (KELSTRUP u. GIBBONS, 1969; BRANDIS u. SMARDA, 1971). Auf die Inaktivierung durch Enzyme des Verdauungstraktes und durch proteolytische Bakterienspezies soll es zurückzuführen sein, daß insbesondere im Darm colicinogene und nicht-colicinogene Stämme miteinander koexistieren können (BRANDIS u. SMARDA, 1971). Möglicherweise findet sich auch hierin die Erklärung, daß im Sektionsmaterial vom Kalb und Ferkel beim gleichen Tier Stämme mit derart divergierenden Eigenschaften nebeneinander nachgewiesen werden konnten.

Die Dominanz von Colicin C und S 1, aber auch von D könnte mit einer Kompatibilität mit R-Faktoren in Zusammenhang stehen. Es fällt auf, daß das Colicin I b der selbstübertragbaren Col-Faktoren der I-Gruppe außerordentlich selten war, was im Gegensatz dazu auf einer Inkompatibilität beruhen könnte. Wenn die anderen beiden Col-Faktoren mit Selbstübertragbarkeit von Typ V oder B nachweisbar waren, so war der eine oder der andere allein nur bei Stämmen vom Ferkel in Erscheinung

getreten. Da die Stämme vom Ferkel weniger als die Stämme von Kälbern sich mehrfachresistent gezeigt hatten, könnte diese Art des Auftretens mit dem Fehlen von R-Faktoren bei diesen Stämmen zu erklären sein. Dafür würde auch sprechen, daß bei Stämmen vom Ferkel auch das Colicin E + I (E 3 + Gruppe I) mit Selbstübertragbarkeit durch I häufiger allein anzutreffen war. Bei den Stämmen vom Kalb war V oder B kaum allein anzutreffen, so daß anzunehmen ist, daß sie innerhalb dieser Stämme stets im rekombinieren Zustand, ins Chromosom integriert, vorlagen. Auffällig war dabei, daß sie gleichzeitig noch vier oder fünf, sogar bis zu elf andere Colicine produzierten, und zugleich multiresistent waren. Sie waren dabei sehr häufig chloramphenicolresistent, und diese Resistenz war ausnahmslos vergesellschaftet mit einer Unempfindlichkeit gegenüber anderen Chemotherapeutika, was für das Vorhandensein von Col- und R-Faktoren beim gleichen Stamm sprechen dürfte.

Da mehrfach arzneimittelresistente, polycolicinogene Stämme vorwiegend beim Kalb und vor allem bei Tieren vorkamen, an die mit Sicherheit oder mit ziemlich großer Wahrscheinlichkeit (Sektionsmaterial) Antibiotika in hohen Dosen verabfolgt worden waren, konnte mit diesen Untersuchungen der Nachweis geführt werden, daß die vor allem von KRCMERY und Mitarbeitern (1970 u. 1972a+b) geäußerte Vermutung der Stimulierung des Auftretens solcher Stämme und deren Selektion bei breiter Anwendung von Antibiotika und Sulfonamiden zu Recht besteht. Nur gelang es bei diesen Untersuchungen meiner Meinung nach erstmals aufzuzeigen, welchen Anteil besonders die Verabreichung von Standardantibiotika in therapeutischer Dosierung hat, daß solche Stämme in den Populationen auch als solche hervortreten. Außerdem konnte der Nachweis erbracht werden, daß unter den derzeitigen Bedingungen einer bereits

weiten Verbreitung von arzneimittelresistenten E. coli-Stämmen sich sogar eine sehr rasch rückläufige Tendenz im Auftreten von R- und Col-Faktor-tragenden Stämmen abzeichnet, wenn die Tiere nicht mehr gegenüber Chemotherapeutika in hoher Dosierung exponiert sind. Die Untersuchungsergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit einer Beschränkung der Verwendung von Standardantibiotika und Sulfonamiden auf eine echte Indikation (KNOTHE, 1972; GUINEE et al., 1972; u.a.). Andernfalls besteht tatsächlich die Gefahr eines Überhandnehmens von Bakterienstämmen mit sog. Omnipotenz, gegen die bei einem Auftreten als Krankheitserreger dann jedes Mittel versagt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

103 aus inneren Organen von 79 an Colibacillose verendeten Ferkeln und Kälbern gezüchtete *E. coli*-Stämme und 357 in gewissen Abständen aus der Faecalflora von 82 in einem Fütterungsversuch stehenden Kälbern isolierte Stämme der gleichen Spezies wurden in vitro hinsichtlich ihrer Unempfindlichkeit gegenüber bestimmten Chemotherapeutika getestet und zugleich auf Colicinogenität geprüft.

Einheitlich wurden alle Stämme im Agardiffusionsverfahren gegenüber acht Antibiotika und dem Sulfonamid Sulphafurazol in niederer und teilweise hoher Konzentration exponiert. Die als colicinogen ermittelten Stämme wurden auch noch im MHK-Test geprüft. Die Untersuchung auf Colicinbildung erfolgte mit der Methode von GEDEK und WEINMANN (1971) unter Verwendung von 17 von FREDERICQ zur Verfügung gestellten Indikatorstämmen. Auf das Vorhandensein haemolysinbildender Eigenschaften und die Zugehörigkeit zu bestimmten enteropathogenen Serotypen wurden nur die Stämme aus Sektionsmaterial untersucht. Die Anzucht der *E. coli*-Stämme aus der Faecalflora erfolgte mit verschiedenen Verfahren unter Verwendung von Tetracyclin-HCl oder Chloramphenicol als Selektivantibiotikum.

Während die Stämme aus Sektionsmaterial sich zu 27,56 % nur gegenüber einem Chemotherapeutikum und zu 70,50 % gegenüber mehreren Stoffen gleichzeitig als resistent erwiesen hatten, wovon 44,66 % zugleich über colicinogene Eigenschaften verfügten, waren nur 5,94 % der Stämme aus der Faecalflora monoresistent und 94,06 % multiresistent, wobei der prozentuale Anteil der colicinogenen Stämme 29,08 % betrug.

Das Vorkommen von Stämmen mit Resistenz gegenüber bis zu sechs oder gar sieben Stoffen gleichzeitig innerhalb der Faecalflora von Kälbern stand im Zusammenhang

mit der Verabreichung von Antibiotika in hoher Dosierung zu Beginn des Fütterungsversuchs. Am häufigsten wurden die Resistenzbilder TSCAKSU, TSCASU und TSSU nachgewiesen. Bei den Stämmen vom Ferkel dominierte eine Resistenz gegenüber Tetracyclinen und Streptomycin gegenüber einer Häufung von Chloramphenicol-Resistenz bei den Stämmen von Kälbern aus Sektionsmaterial und der Faecalflora. Die Mehrzahl der MHK-Werte lag beim Tetracyclin-HCl bei 128 mcg/ml, beim Streptomycin bei <32 mcg/ml und beim Chloramphenicol bei > 256 mcg/ml.

Von den 144 insgesamt colicinogenen E. coli-Stämmen bildete die Mehrzahl mehrere Colicine. Die Stämme vom Ferkel produzierten hauptsächlich Colicine vom Typ C, S 1, S 3 + I, F, D und S 5. Die Stämme von Kälbern bildeten dagegen alle Typen, für die Teststämme zur Verfügung standen; hier dominierte allerdings C, D, S 1, E + I, F. Es ergaben sich insgesamt 56 Merkmalskombinationen. Dabei waren die selbstübertragbaren Col-Faktoren V, B und I seltener anzutreffen als die nicht selbstübertragbaren, weshalb eine Exklusion durch R-Faktoren angenommen wird. Eine große Zahl der Stämme vom Kalb aus Sektionsmaterial erwies sich jedoch als multiresistent und polycolicinogen, mit der Befähigung Colicine vom Typ V und B zu bilden.

Ein Rückgang in der Zahl der Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika war bei den E. coli-Stämmen der Kälber, die Flavomycin oder Zinkbacitracin als Futterzusatzstoff erhalten hatten, zu verzeichnen. Die Stämme waren nicht mehr in so hohem Maße gegenüber Chloramphenicol, Ampicillin und Kanamycin resistent als zuvor. Die colicinogenen Stämme bildeten unter dieser Voraussetzung pro Stamm ein oder zwei Colicine weniger als diejenigen, die zu Beginn des Fütterungsversuchs von den Tieren isoliert worden waren. Es handelte sich dabei vornehmlich um die nicht selbstübertragbaren Typen.

Hiermit wurde erstmals nachgewiesen, daß sich bei *E. coli*-Stämmen mit Verwendung der neuen Fütterungsantibiotika nicht nur die Resistenzeigenschaften ändern, sondern daß davon auch andere extrachromosomal in der Bakterienzelle verankerte Merkmale betroffen sein können.

Sowohl das Vorhandensein von Colicinogenie, als auch die Art der gebildeten Colicine standen bei den Stämmen des Sektionsmaterials in keinem Zusammenhang mit der Zugehörigkeit zu einer bestimmten Serogruppe, noch ergab sich beim Nachweis eines Haemolysinbildungsvermögens überhaupt eine Beziehung zur Arzneimittelresistenz oder Colicinogenie eines Stammes.

Die Feststellung des Vorkommens von colicinogenen und nichtcolicinogenen Stämmen in den inneren Organen an Colibacillose verendeter Tiere weist auf die Möglichkeit einer Koexistenz solcher Stämme hin. Bei der Züchtung von col^+ - und col^- -Stämmen kann jedoch das gewählte Verfahren das Ergebnis beeinflussen.

5. SUMMARY

103 *E. coli* strains isolated from the internal organs of 79 piglets and calves died of colibacillosis as well as 357 *E. coli* strains isolated from calves being under a feeding experiment were tested on their antibiotic resistance and their colicinogeny.

All these strains were tested by agar diffusion with regard to their resistance against eight antibiotics and sulphafurazol in a low and some of them in a high concentration. MIC was tested of all colicinogenic strains. Colicinogeny was investigated in accordance with the method of GEDEK and WEINMANN (1971) using 17 indicator strains.

Only the strains from section-specimens were examined on hemolytic activity and on their sero-groups. The isolation of *E. coli* strains from faeces was performed with different methods using Tetracyclin-HCl or Chloramphenicol as selective antibiotics.

27,65 % of strains from section-specimens were monoresistant, 70,50 % were multiresistant towards the tested drugs; 44,66 % of these strains were colicinogenic. Only 5,94 % of the strains from faeces were monoresistant and 94,06 % were multiresistant; the percentage of colicinogenic strains was 29,08 %.

The occurrence of strains in the faecal flora which were resistant against six or even seven antibiotics at the same time was related with the application of antibiotics in high dosage at the beginning of the feeding experiment. TSCAKSU, TSCASU and TSSU were the most frequent resistance patterns. A resistance against Tetracyclin and Streptomycin dominated within the strains of piglets in contrast to a higher Chloramphenicol resistance within the strains of calves. MIC rate of the most part was with Tetracyclin-HCl 128 mcg/ml, with Streptomycin < 32 mcg/ml and with Chloramphenicol > 256 mcg/ml.

Most of the 144 colicinogenic strains produced several colicins. Piglet's strains produced mainly the colicins C, S 1, S 3 + I, F, D and S 5. In contrast to this the calf's strains formed all tested colicins, but C, D, S 1, E + I, F dominated. 56 different colicin patterns were found. The self-transferable col-factors V, B and I were not so often found as the non self-transferable, that's why an exclusion by R-factor is supposed. A great number of calves strains from section-specimens proved to be multi-resistant and polycolicinogen; besides they were able to form colicins of type V and B. The decrease in the number of resistances against antibiotics could be found with the E. coli strains of calves, which had been fed with Flavomycin or Zinkbacitracin. The resistance against Chloramphenicol, Ampicillin and Kanamycin was not as high as before. Under these conditions the colicinogenic strains formed one or two colicins less than those which had been isolated by the animals at the beginning of the feeding experiment. Above all the non self-transferable colicins decreased.

The results of these experiments with E. coli proved for the first time, that using the new feeding antibiotics not only the drug-resistance but also other extrachromosomal located characteristics are changed.

No relation between colicinogeny, sero-type or hemolytic activity was found with the strains from section-specimens. The incidence of colicinogenic and non-colicinogenic strains in the section-specimens of animals died of colibacillosis shows the possibility of a co-existence of such strains. The chosen method, however, can affect the result of the isolation of col⁺- and col⁻-strains.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ABRAHAM, E.P., CHAIN, E., FLETCHER, C.M., FLOREY, H.W.,
GARDNER, A.D., HEATLEY, N.G., JENNINGS, M.A., 1941:
Further observations on penicillin. *Lancet* II, 176
- ACHTMANN, M., WILLETS, N., CLARK, A.J.P., 1971:
Beginning a genetic analysis of conjugational transfer
determined by the F-factor in *Escherichia coli* by
isolation and characterization of transfer deficient
mutants. *J. Bact.*, 106, 529
- AKIBA, T., KOYAMA, Y., ISSIKI, S., KIMURA, S., FUKUSHIMA,
T., 1960: On the mechanism of the development of
multiple drug-resistant clones of *Shigella*. *Jap. J.*
Microbiol., 4, 219
- ALWIS, M.C.L. DE, THOMLINSON, J.R., 1973: The incidence
and distribution of colicinogenic and colicinsensitive
Escherichia coli in the gastro-intestinal tract of
the pig. *J. gen. Microbiol.*, 74, 45
- ANDERSON, E.S., 1967: Facteurs de transfer et résistance
aux antibiotiques chez les *Enterobacteriaceae*. *Annls.*
Inst. Pasteur, Paris, 112, 547
- ANDERSON, E.S., 1968: The ecology of transferable drug
resistance. *Ann. Rev. Microbiol.*, 22, 131
- ANDERSON, E.S., 1969: Practical significance of extrachro-
mosomal elements. *J. gen. Microbiol.*, 55, VI
- ANDERSON, E.S., 1970: In: Observations on the ecological
effects of antibacterial drugs. Resistance to in-
fectious diseases, ed. R.H. DUNLOP u. H.W. MOON -
Saskatoon Modern Press, S. 157
- ANDERSON, E.S., DATTA, N., 1965: Resistance to penicillins
and its transfer in *Enterobacteriaceae*. *Lancet* II, 407
- ANDERSON, E.S., LEWIS, M.J., 1965: Characterisation of a
transfer factor associated with drug resistance in
Salmonella typhimurium. *Nature (London)*, 208, 843

- AOKI, T., OGATA, Y., WATANABE, T., 1971: Detection of resistance factors in fish pathogens *Aeromonas liquefaciens*. J. gen. Microbiol. 65, 343
- ARAI, T., OGATA, Y., WATANABE, T., 1970: Episomic resistance factors in Enterobacteriaceae: 40. Colicin resistance and tolerance conferred by R-factors. Med. Biol. (Tokyo), 79, 209
- BARON, L.S., FALKOW, S., 1961: Genetic transfer of episomes from *Salmonella typhosa* to *Vibrio cholerae*. Genetics, 46, 849
- BAUER, A.W., KIRBY, W.M., SHERRIS, J.L., TURCK, M., 1966: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. Clin. Path. 45, 493
- BENVENISTER, R., DAVIS, J., 1971: Enzymatic acetylation of Aminoglycoside antibiotics by *Escherichia coli* carrying an R-factor. Biochemistry, 10, 1787
- BRANA, H., HUBACEK, J., KÖNIG, J., 1973: The effect of Actinomycin D and Flavomycin on *E. coli* R⁺ strains. Folia Microbiol. 18, 257
- BRANDIS, H., 1965: Die experimentelle Übertragung von Arzneimittelresistenz unter Bakterienstämmen. Klin. Wschr. 43, 5
- BRANDIS, H., SMARDA, J., 1971: Bacteriocine und bacteriocinähnliche Substanzen. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- BRESCH, C., 1970: Klassische und molekulare Genetik. Springer Verl., Berlin, Göttingen, Heidelberg
- BRINTON, C., GEMSKI, P., CARNAHAN, J., 1964: A new typ of bacterial pilus genetically controlled by the fertility factor of *Escherichia coli* K 12 and its role in chromosome transfer. Proc. natn. Acad. Sci. USA, 52, 776
- BRUNNER, R., 1972: Zum Themenkreis Antibiotikaresistenz Zbl. Bakt. I. Ref., 230, 319

- BRYSON, V., SZYBALSKI, W., 1955: Microbial drug resistance. Adv. Genet., 7, 1
- CAMPBELL, A.M., 1969: Episomes. New York, Harper a. Row
- COETZEE, J.N., DATTA, N., HEDGES, R.W., 1972: R-factors from *Proteus rettgeri*. J. gen. Microbiol. 72, 543
- CHABBERT, Y.A., 1963: L'antibiogramme. Ed. de la Tourelle, Saint-Mandé.
- CHABBERT, Y.A., LE MINOR, L., 1966: Transmission de la résistance a plusieurs antibiotiques chez les Entérobactériaceae. Presse méd. 74, 2407
- CHABBERT, Y.A., SCAVIZZI, M.R., WITCHITZ, J.L., GERBAUD, G.R., BOUANCHAUD, D.H., 1972: Incompatibility groups and the classification of fi^- R-factors. J. Bact. 112, 666
- CLOWES, R.C., 1963: Co-operation of two sex factors in *Escherichia coli* K 12. Biochem. biophys. Res. Comm. 13, 449
- CLOWES, R.C., HAUSMANN, C., NISIOKA, T., MITANI, M., 1968: Interactions of Col B and R-factors and electron microscopy of R-factor DNA. Proc. XII. internat. Congress Genetics, Tokyo, 2, 241
- CRAVEN, J.A., BARNUM, D.A., 1969: Ecological studies of *Escherichia coli* in normal young pigs. Can. Vet. J., 10, 202
- DATTA, N., KONTOMICALOU, P., 1965: Penicillinase synthesis controlled by infectious R-factors in Enterobacteriaceae. Nature, London, 208, 239
- DATTA, N., HEDGES, R.W., 1971: Compatibility groups among fi^- R-factors. Nature, London, 234, 222
- DEMEREK, M., 1955: Microbial drug resistance. Publ. Hlth. Rep., Wash., 70, 817

- DEMEREK, M., 1957: Drug resistance in microorganisms. Ciba-Foundation Symposium, Churchill, London, 47
- DUBNAU, E., STOCKER, B.A.D., 1967: Behaviour of three colicine factors and an R (drug-resistance) factor in Hfr crosses in *Salmonella typhimurium*. Genet. Res. 9, 283
- EHRLICH, P., 1907: Chemotherapeutische Trypanosomen-Studien. Berl. klin. Wschr. 44, 233
- FEARY, T.W., STURTEVANT, A.B. jr., LANKFORD, J., 1972: Antibiotic - resistant coliforms in fresh and salt water. Arch. Environ. Health., 25, 215
- FEDERIC, F., SOKOL, A., RAJTAR, U., SIMANSKY, S., HAMROVA, S., SOVIK, M., POLAKOVA, O., 1973: The dynamic of changes in resistance to antibiotics in pigs fed Flavomycin. Folia Microbiol. 18, 176
- FILICHKIN, S.E., KAREVA, V.A., KAGAN, A.N., DIMCHENKOVA, K.M., 1969: Application of a test of determination of colicinogenicity of dysentery bacilli in epidemiological analysis of diseases caused by them. Zh. Microbiol. Epidemiol., Immunobiol., 46, 2, 22
- FILICHKIN, S.E., GURKOVA, E.A., FILICHKINA, N.E., 1973: Combined action of colicins and antibiotics on *Shigellae* and common *Escherichia* (Russ.). Zh. Microbiol. Epidemiol., Immunobiol., 8, 72
- FORTUSHNYI, V.A., TUPITSA, L.G., 1973: Multiple resistance of *Escherichia coli* to antibiotics. Veterinariya, 6, 97
- FREDERICQ, P., 1954: Transduction génétique des propriétés colicinogènes chez *Escherichia coli* et *Shigella sonnei*. C. r. Séance Soc. biol., 148, 399
- FREDERICQ, P., 1958: Colicines and colicinogenic factors. Symp. Soc. exp. Biol., 12, 104

- FREDERICQ, P., 1959: Transduction par bactériophage des propriétés colicinogènes chez *Salmonella typhimurium*. C. r. Séanc. Soc. biol., 153, 357
- FREDERICQ, P., 1963: On the nature of colicinogenic factors: a review. J. Theoret. Biol., 4, 159
- FREDERICQ, P., 1969: The recombination of colicinogenic factors with other episomes and plasmids. In: G.E.W. Wolstenholme a. M.O'Connor: Ciba Foundations Symposium on Bacterial Episomes and Plasmids S. 163. Churchill, Ltd. London
- FREDERICQ, P., 1971: Colicine resistance associated with R-factors. VII. Intern. Congr. of Chemotherapy, Praha, Abstr. of Comm.
- FREDERICQ, P., KRCMERY, V., KETTNER, M., 1971: Transferable colicinogenic factors as mobilizing agents for extrachromosomal Streptomycin resistance. Z. Allg. Mikrobiol., 11, 11
- FREDERICQ, P., DELHALLE, E., 1972 a: Genetics of colicinogenic factors and their recombination with R-factors. In: KRCMERY, V., ROSIVAL, L., WATANABE, T.: Bacterial plasmids and antibiotic resistance, Avicenum Prag, Springer Berlin-Heidelberg-New York, S. 203
- FREDERICQ, P., DELHALLE, E., 1972 b: Recombinaison entre facteur R et facteur colicinogènes chez *Escherichia coli* K 12. I. Production des Recombinants. Annls. Inst. Pasteur, Paris, 122, 909
- FREDERICQ, P., DELHALLE, E., 1973: Recombinaison entre facteurs R et facteurs colicinogènes chez *Escherichia coli*. II. Analyse des recombinants par conjugaison. Annls. de Mikrobiol., 124, 459
- FRYDMAN, A., MEYNELL, E., 1969: Interactions between de-repressed F-like R-factors and wild type colicin B factors: superinfection immunity and repressor susceptibility. Genet. Res., 14. 315

- GARBER, N., FRIMERMAN, H., 1973: Resistance of enteropathogenic strains of *Escherichia coli* to penicillins and cephalosporin. *Israel J. Med. Sci.*, 9, 888
- GARDENER, J.F., 1950: Some antibiotics formed by *Bacterium coli*. *Brit. J. exp. Path.* 31, 102
- GEDEK, B., 1972: Vorkommen antibiotikaresistenter Bakterien innerhalb der Faecalflora von Wiederkäuern. *Zbl. Bakt. I. Orig. A* 220, 130
- GEDEK, B., 1973: Fragen der Sensibilisierung und Resistenzbildung bei Bakterien durch bestimmte Wirkstoffe. Bericht der AID-Tagung "Einsatz von Wirkstoffen in der tierischen Produktion", Frankfurt
- GEDEK, W., WEINMANN, N., 1971: Routineverfahren zum Nachweis der Sensibilität Koagulase negativer boviner *Micrococcaceae* gegenüber bacteriocinähnlichen Substanzen. *Zbl. Vet. Med. B.*, 18, 819
- GEROK, G.J., LITINSKY, Y.J., GODOVANNY, B.A., 1973: Colicines as factors of *Escherichia* and *Shigella* antagonism in the process of dysenterie infection. II. The influence of colicines (Russ.). *Zh. Microbiol., Epidemiol., Immunobiol.*, 8, 121
- GILLESSEN, G., GILLESSEN, I.M., 1960: Die Resistenzbildung bei Mikroorganismen. *Ergebn. Mikrobiol.* 33, 128
- GINOZA, H.S., MATNEY, T.S., 1963: Transmission of resistance transfer factor from *Escherichia coli* to two species of *Pasteurella*. *J. Bact.*, 85, 1777
- GRATIA, A., 1925: Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de *Colibacille*. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 93, 1040
- GRATIA, A., FREDERICQ, P., 1946: Diversité de souches antibiotiques de *E. coli* et étendu variable de leur champs d'action. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 140, 1032

- GRINDLEY, N.D.F., GRINDLEY, J.N., ANDERSON, E.S., 1972:
R-factor compatibility groups. *Molec. genet.* 119, 287
- GÜNTHER, E., 1969: *Grundriß der Genetik*. Gustav Fischer
Verl., Stuttgart
- GUINEE, P.A.M., FRIK, J., UGUETO, N.R., LEEUWEN, W.J.VAN,
KOL, P.J.VAN, 1972: Resistance factors in the in-
testinal coli flora of veal calves. *Tijdschr.*
Diergeneesk., 97, 705
- HALLMANN, L., BURKHARDT, F., 1974: *Klinische Mikrobio-
logie*, Georg Thieme Verl., Stuttgart
- HAMON, Y., PERON, Y., 1965: Etude des propriétés induc-
trice de certaines colicines. *C. r. Acad. Sci.*,
Paris, 260, 5984
- HAMON, Y., CHABBERT, Y.A., 1970: Relations entre
facteurs colicinogènes et facteurs de résistance
chez une souche de *S. panama*. *C. r. Séanc Acad. Sci.*,
Paris, 271, 259
- HARADA, K., SUZUKI, M., KAMEDA, M., MITSUHASHI, S.,
1960: On the drug resistance of enteric bacteria. II.
Transmission of the drug resistance among *Enterobac-
teriaceae*. *Jap. J. exper. Med.*, 30, 289
- HAYES, W., 1964: *The genetics of bacteria and their
viruses*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- HEDGES, R.W., DATTA, N., 1971: fi^- R-factors giving
Chloramphenicol resistance. *Nature*, 234, 220
- HEEVER, L.W., VAN DEN, 1972: Antibiotic resistance and
R-factors in *Escherichia coli* from calves, meat and
milk. *Jl. Afr. vet. med. Ass.*, 43, 71
- HELLER, E.D., SMITH, H.W., 1973: The incidence of anti-
biotic resistance and other characteristics amongst
Escherichia coli strains causing fatal infection in
chicken: the utilisation of these characteristics
to study the epidemiology of the infection. *J. Hyg.*
Camb., 71, 771

- HETTIARATCHY, I.G.T., COOKE, E.M., SHOOTER, R.A., 1973: Colicine production as an epidemiological marker of *Escherichia coli*. J. Med. Mikrobiol., 6, 1
- HIRSCH, D.C., 1973: Multiple antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. J. Am. vet.med. Ass., 162, 885
- HOLLAND, I.B., 1967: Bacteriocins. Antibiotics 1 (ed.: GOTTLIEB, D., SHAW, P.D.) Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- HORAK, V., LANC, A., 1973: Colicins of *Escherichia coli* strains causing urinary tract infections, sensitivity of these strains towards colicins, and their O-Serotypes. Folia microbiol., Praha, 18, 332
- HUHTANEN, C.N., NAGHSKI, J., DELLAMONICA, E.S., 1972: Microfermentation series for identification of single colonies of Enterobacteriaceae. Appl. Mikrobiol. 24, 618
- IIJMA, T., 1962: Transfer of a colicinogenic factor with multiple resistance factor in *Escherichia coli* K 12. Jap. J. Genet., 37, 187
- IKARI, N.S., KENTON, D.M., YOUNG, V.M., 1969: Interaction in the germfree mouse intestine of colicinogenic and colicin-sensitive microorganisms. Proc. Soc. exper. Biol. Med., 130, 1280
- IVANOVICS, G., 1962: Bacteriocins and bacteriocin-like substances. Bact. Rev., 26, 108
- JACOB, F., WOLLMANN, E.L., 1958: Les épisomes, éléments génétiques ajoutés. C. r. Séanc. Acad. Sci., Paris, 247, 154
- JACOB, F., WOLLMANN, E.L., 1961: Sexuality and the genetics of bacteria. New York/London
- JACOB, F., LWOFF, A., SIMINOVITCH, L., WOLLMANN, E.L. 1966: Symposia Biologica Hungarica. Sammelwerk Red. Györry

- JAKOVINA, M., 1972: Colicine production by *Escherichia coli* strains isolated from the intestine of chickens. Vet. Arh., 42, 255
- JAROLMEN, H., KEMP, G., 1969: Association of increased recipient ability for R-factors and reduced virulence among variants of *Salmonella choleraesuis* var. kanzendorf. J. Bact., 97, 962
- JINKS, J.L., 1967: Extrachromosomale Vererbung. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- KATO, Y., HANAOKA, M., AMANO, T., 1962: The elimination of a colicinogenic factor by a drug-resistance transferring factor in *Escherichia coli* K 235. Biken's J., 5, 77
- KELSTRUP, J., GIBBONS, R.J., 1969: Inactivation of bacteriocins in the intestinal canal and oral cavity. J. Bact., 99, 888
- KHATOON, H., IYER, R.V., IYER, V.N., 1972: A new filamentous bacteriophage with sexfactor compatibility. Virology, 48, 145
- KNOTHE, H., 1972: Übertragbare Arzneimittelresistenz bei Enterobacteriaceae. Zbl. Bakt., I Ref., 230, 321
- KRCMERY, V., JANOUSKOVA, J., 1969a: Mutual relations of colicinogenic factors and resistance determinants in *Escherichia coli*. Z. allg. Mikrobiol., 9, 191
- KRCMERY, V., JANOUSKOVA, J., 1969b: Transferable Tetracycline resistance in *Salmonella typhimurium* and *Shigella sonnei* derived from resistant strains of *Escherichia coli*. Z. allg. Mikrobiol., 9, 397
- KRCMERY, V., KETTNER, M., 1970: Infektiöse Resistenz und Antibiotikatherapie. Umschau, 24, 772
- KRCMERY, V., HURWITZ, C., FREDERICQ, P., 1970: Loss of colicinogeny in *Escherichia coli* strains infected by certain resistance factors. J. Bact., 102, 521

- KRCMERY, V., ROSIVAL, L., VYMOLA, F., HEJZLAR, M., 1972: Problems of transferable antibiotic resistance in Czechoslovakia. In: KRCMERY, V., ROSIVAL, L., WATANABE, T.; Bacterial plasmids and antibiotic resistance, Avicenum Prag, Springer Berlin-Heidelberg-New York, 1972, S. 13
- KRCMERY, V., WIEDEMANN, B., 1972: Häufigkeit und Aktivität übertragbarer Colicinfaktoren in *Escherichia coli* Wildtypen, die R-Faktoren tragen. *Arzneimittelforsch.*, 22, 1771
- KUDLAJ, D.G., BALANIN, N.V., 1968: Der colicinogene V -i R-Faktor bei *E. coli* und sein Verhalten bei der Konjugation (Russ.). *Genetica*, 4, 71
- KUWAHARA, S., AKIBA T., KOYAMA, K., ARAI, T., 1963: Transmission of multiple drug resistance from *Shigella flexneri* to *Vibrio comma* through conjugation. *Jap. J. Microbiol.*, 7, 61
- LARSEN, J.E., LARSEN, J.L., 1972: Occurence and distribution of drug resistant *Escherichia coli* in faeces from cattle and pigs. *Nord. VetMed.*, 24, 651
- LAVALLE, R., JACOB, F., 1961: Sur la sensibilité des épisomes sexuel et colicinogène d'*Escherichia coli* K 12 à la désintégration du radiophosphore. *C. r. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 252, 1678
- LEBEK, G., 1963: Über die Entstehung mehrfach resistenter Salmonellen. Ein experimenteller Beitrag. *Zbl. Bakt., I. Orig.*, 128, 494
- LEBEK, G., 1969: Die infektiöse bakterielle Antibiotikaresistenz. Verlag H. Huber, Bern, Stuttgart
- LEBEK, G., 1970: Einflüsse der antibakteriellen Arzneimittel im Tierfutter auf das Auftreten von Antibiotika- und chemoresistenten pathogenen Bakterien. *Zbl. Vet. Med. B* 17, 103

- LEBEK, G., 1972 a: Determinanten in R-Faktoren und deren Wirkungen. Zbl. Bakt., I. Ref., 230, 321
- LEBEK, G., 1972 b: Epidemiological investigations of R-factor in man and animal in Switzerland. In: KROMERY, V., ROSIVAL, L., WATANABE, T.: Bacterial plasmids and antibiotic resistance, Avicenum Prag, Springer Berlin-Heidelberg-New York, S. 47
- LEBEK, G., SCHMIEDEL, A., 1964: Infektiöse Mehrfachresistenz gegen Antibiotika und Sulfonamiden bei Ruhrbakterien. Dt. med. Wschr., 89, 2464
- LEDERBERG, J., 1951: Streptomycin resistance: a genetically recessive mutation. J. Bact., 61, 549
- LEDERBERG, J., LEDERBERG, E., 1952: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bact. 63, 399
- LEPPER, M.H., 1955: Microbial resistance to antibiotics. Ann. Intern. Med., 43, 299
- LURIA, S.E., DELBRÜCK, M., 1943: Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics, 28, 491
- MAC LEAN, F.H., ROGERS, K.B., FLEMING, A., 1939: M.a.B. 693 and Pneumococci. Lancet, I, 562
- MARKOVIC, B.S., RANISAVLJEVIC, M., KRSTIC, V., KRDZALIC, P., 1972: Types of Escherichia coli isolated from calf units in Belgrade. Vet. Glasn., 26, 609
- MARTIN, W.J., YU, P.K.W., WASHINGTON, J.A., 1971: Evaluation of the Enterotube system for identification of members of the familiy Enterobacteriaceae. Appl. Microbiol., 22, 96
- MEYNELL, G.G., 1969: Exclusion superinfection immunity and abortive recombinants in I^+ x I^+ bacterial crosses. Genet. Res., 13, 113

- MEYNELL, E., MEYNELL, G.G., DATTA, N., 1968: Pylogenetic relationships of drug-resistance factors and other transmissible bacterial plasmids. *Bact. Rev.*, 32, 55
- MITSUHASHI, S., OSHIMA, H., KAWAHARADA, U., HASHIMOTO, H., 1960: Multiple resistance of enteric bacteria and transmission of drug resistance to other strains by mixed cultivation. *Jap. J. exper. Med.*, 30, 179
- MITSUHASHI, S., OSHIMA, H., KAWAHARADA, U., HASHIMOTO, H., 1965: Drug resistance of Staphylococci. I. Transduction of Tetracycline resistance with phage lysates obtained from multiply resistant Staphylococci. *J. Bact.*, 89, 967
- MORRISON, T., MALAMY, M.H., 1970: Comparisons of F-factors: Existence of independent regulation groups in F-factors. *J. Bact.*, 103, 81
- MOYED, H.S., 1964: Biochemical mechanism of drug resistance. *Ann. Rev. Mikrobiol.*, 18, 347
- MULCZYK, M., LAWRENCE, K., 1966: Simultaneous transfer of two episomes, colicinogenic factor I and resistance transfer factor, present in the same donor. *Arch. immun. ther. exp.*, 14, 1
- NABBUT, N.H., SALMO, G., 1973: Transferable drug resistance among *Escherichia coli* isolated from human faeces and urine. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, A 124, 293
- NATOLI, D., GIAMMANCO, G., CASCIO, G., MACCHIARELLA, M., 1971: Fattori di resistenza ai chemoterapici in *Shigella* e *Colibacilli* enterogeni isolati da casi di gastroenterite infantile. *Boll. Ist. sieroter. milan.*, 50, 41
- NAVASIN, S.M., FOMINA, I.P., 1972: Multiple drug resistance of pathogens in purulent surgical infection. In: KRCMERY, V., ROSIVAL, L., WATANABE, T.: *Bacterial plasmids and antibiotic resistance*, Avicenum Prag, Springer Berlin-Heidelberg-New York, S. 55

- NOVAKOVA, Z., STYKOVA, S., KRCMERY, V., PARRAKOVA, E.,
1969: Occurrence of colicinogenic strains among
Tetracycline resistant strains of *Escherichia coli*.
Z. allg., Mikrobiol., 9, 399
- NOVICK, R.P., 1969: Extrachromosomal inheritance in
bacteria. *Bact. Rev.*, 33, 210
- NOVICK, R.P., RICHMOND, M.H., 1965: Nature and inter-
actions of the genetic elements governing Peni-
cillinase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *J.*
Bact., 90, 647
- NOVICK, R.P., MORSE, S., 1967: In vivo transmission of
drug resistance factors between strains of *Staphylo-*
coccus aureus. *J. exper. Med.*, 125, 45
- OCHAI, K., 1962: Studies on the transfer of drug re-
sistance. *Chemotherapia*, 10, 47
- PANSE, M.U., WADHWA, K.M., 1973: Incidence of resistance
transfer factor (R-factor) among Enterobacteriaceae
urinary tract infections. *Indian J. med. Res.*,
60, 1954
- PAPAVASSILIOU, J., 1960: Colicinogenie et sensibilité
aux colicines des *Escherichia* d'origines humaine et
animale. *Arch. Inst. Pasteur, Tunis*, 37, 103
- POHL, P., THOMAS, J., 1972: Multiple resistance to
antibiotics among *Escherichia coli* strains isolated
from calves with septicaemia in 1970 and 1971.
Annls. Méd. Vét., 116, 571
- POLLOCK, M.R., 1960: Drug resistance and mechanisms
for its development. *Br. med. Bull.*, 16, 16
- REBROVA, R.N., GOROKHOV, V.I., RAZARENOV, M.A., 1972:
Distribution of episomal resistance in *Shigellae* and
enteropathogenic *Escherichia coli*, isolated from the
patients. *Zh. Mikrobiol. Epidem. Immunbiol. (Moskau)*,
49, 119

- REEVES, P., 1965: The bacteriocins. Bact. Rev., 29, 24
- RENAULT, L., ROUX, J., 1972: Resistance to antibacterial agents of Escherichia coli from intestinal flora of poultry fed (or not fed) nutritional doses of antibiotics. Recl. Méd. Vét., 148, 1035
- RICHMOND, M.H., 1969: Extrachromosomal elements and the spread of antibiotic resistance in bacteria. Biochem. J., 113, 225
- RIECK, G.W., 1971: Krankheitsresistenz und Krankheitsdisposition. Tierzuchtungslehre, 2.Aufl., ed. SOHBURG, G., Stuttgart.
- RITZERFELD, W., 1974: Bakterienresistenz unter besonderer Berücksichtigung der infektiösen Resistenz. Der Urologe, 13, 11
- ROLLE, M., 1969: Über die Antibiose der Mikroorganismen unter besonderer Berücksichtigung der Colicine. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 7, 121
- ROMERO, E., 1970: Two classes of f_i^- R-factors. Boll. Ist. sieroter. milan., 49, 484
- ROTH, T.F., HELINSKI, D.R., 1967: Evidence for circular DNA forms of a bacterial plasmid. Proc. natn. Acad. Sci., USA, 58, 650
- ROWND, R., NAKAYA, R., NAKAMURA, A., 1966: Molecular nature of the drug resistance factors of the Enterobacteriaceae. J. molec. Biol., 17, 376
- SCAIFE, J., 1967: Episomes. Ann. Rev. Mikrobiol., 21, 601
- SCHNITZER, R.J., GRUNBERG, E., 1957: Drug resistance of microorganisms. Academic Press Inc., New York
- SHAW, W., 1966: Antimicrobial agents and chemotherapy, 221; zit. n. WALTER u. HEILMEYER, 1969, a.a.O.

- SICCARDI, A.G., 1966: Colicin resistance associated with resistance factors in *Escherichia coli*. Genet. Res., 8, 219
- SMARDA, J., 1971: Colicine. In: BRANDIS, H., SMARDA, J., Bacteriocine und bacteriocinähnliche Substanzen. VEB Gustav Fischer Verl.
- SMITH, D.H., 1967: Genetic composition of R-factors. Abstr. V. Intern. Congr. Chemother. (Wien), 2, 1205
- SMITH, H.W., 1972: The effect on virulence of transferring R-factors to *Salmonella typhimurium* in vivo. J. med. Microbiol., 5, 451
- SMITH, H.R., GRINDLEY, N.D.F., HUMPHREYS, G.O., ANDERSON, E.S., 1973: Interaction of group H resistance with the F-factor. J. Bact., 115, 623
- SOKOL, A., FEDERIC, F., 1974: Influence of colinogenic strain, given perorally on the occurrence of various plasmids in *E. coli* in piglets fed by Flavomycin. Vortrag, Kolloquium on R-factors in Smolenice, CSSR
- SØGAARD, H., 1973: Incidence of drug resistance and transmissible R-factors in strains of *Escherichia coli* isolated from faeces of healthy pigs. Acta vet. scand., 14, 381
- STEPHAN, R., BULLING, E., 1971: Das Vorkommen von antibiotikaresistenten coliformen Keimen in der Darmflora von Menschen und verschiedenen Haustieren. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 94, 30
- STEPHENS, J.F., LAKHOTIA, R.L., 1973: Drug resistant bacteria from Ohio hatching eggs. Ohio Rep. Res. Dev. in Agriculture, Home Econ., Nat. Res., 58, 23
- STROKOV, V.E., 1971: Colicine types of *Escherichia coli* strains isolated in this country and attempts for conjugational transmission of some col-factors. Bulg. Acad. Sci., II. Congr. Sofia, 69, 19

- SWANSON, K.P., MERZ, W., YOUNG, J., 1970: Zytogenetik.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- SZTURM - RUBINSTEIN, S., DIXON, S.J., PIECHAUD, D.,
GASSER, A., 1973: Colicintype, Lysotope, Antibio-
et Sulfamido - résistance chez 243 souches de
Shigella sonnei. Intéret de L'Etude de ces trois
caractères a Adélaide (Australie) de 1970 a 1972.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 124 B, 307
- THIELE, E.H., 1970: Viruelce of R-factor bearing
Salmonella typhimurium. Infect. Immunity, 2, 516
- TOMESCU, V., DECUN, M., 1972: Einige Eigenschaften der
aus Trinkwasser und Abwasser von Tierfarmen iso-
lierten Colibakterien. Arch. ex. VetMed., 26, 847
- TRCKA, J., WILLINGER, H., 1972: Colicinogene Coli-
stämmе beim Ferkel. Zbl. Bakt., I. Ref., 230, 344
- TRUSZYNSKI, M., BORKOWSKA - OPACKA, B., 1969: Untersu-
chungen über die infektiöse Antibiotikaresistenz
von Escherichia coli-Stämmen, die aus kranken Schwei-
nen isoliert waren. Md. dóswiad. Mikrobiol., 21, 357
- VASENIUS, H., 1966: Factors influencing the rapid
multiplication of enteropathogenic porcine Escheri-
chia coli strains with special reference to their
colicinogenic and fermentative properties. Theses.
Helsinki
- WALTER, A.M., HEILMEYER, L., 1969: Antibiotika-Fibel.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- WATANABE, T., 1963 a: Episome mediated transfer of drug
resistance in Enterobacteriaceae: VI. High-frequency
resistance transfer system in Escherichia coli.
J. Bact., 85, 788
- WATANABE, T., 1963 b: Infective heredity of multiple
drug resistance in bacteria. Bact. Rev., 27, 87

- WATANABE, T., 1967: Evolutionary relationship of R-factor with other episomes and plasmids. Fed. Proc., 26, 23
- WATANABE, T., 1971: Infectious drug resistance. Current Topics in Microbiol. Immunobiol., 56, 43. Springer Verl. Berlin-Heidelberg-New York
- WATANABE, T., 1972: Further outlooks of antibiotics in the shadows of resistance factors. In: KRCMERY, V., ROSIVAL, L., WATANABE, T. Bacterial plasmids and antibiotic resistance, Avicenum Prag, Springer Berlin-Heidelberg-New York, S. 9
- WATANABE, T., FUKASAWA, T., 1960: "Resistance transfer factor", an episome in Enterobacteriaceae. Biochem. biophys. Res. Commun., 3/6, 660
- WATANABE, T., FUKASAWA, T., 1961: Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. I. Transfer resistance factors by conjugation. J. Bact., 81, 669
- WATANABE, T., FUKASAWA, T., 1962: Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. IV. Interactions between resistance transfer factor and F-factor in Escherichia coli K 12. J. Bact. 82, 727
- WATANABE, T., SATO, S., 1964: Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae: VIII. Six drug resistance R-factor. J. Bact., 86, 922
- WATANABE, T., NISHIDA, H., OGATA, C., ARAI, T., SATO, S., 1964: Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae: VII. Two types of naturally occurring R-factors. J. Bact., 88, 716
- WATANABE, T., OGATA, Y., 1970: Genetic stability of various resistance factors in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. J. Bact., 102, 363

- WIEDEMANN, B., 1972: Resistance transfer in vivo and its inhibition. In: KRCMERY, V., ROSIVAL, L., WATANABE, T. Bacterial plasmids and antibiotic resistance, Avicenum Prag, Springer Berlin-Heidelberg-New York, S. 75
- WIEDEMANN, B., KNOTHE, H., HOLZER, P., 1969: Untersuchungen über die Verbreitung von R-Faktoren. Zbl. Bakt., I. Orig., 212, 97
- ZELLE, M.R., LEDERBERG, J., 1951: Single cell isolations of diploid heterozygous Escherichia coli. J. Bact., 61, 351
- ZEUTHEN, J., PATO, M.L., 1971: Replication of the F-lac sex factor in the cell cycle of Escherichia coli. Molec. Genet., 111, 242
- ZINDER, N.D., LEDERBERG, J., 1952: Genetic exchange in Salmonella. J. Bact., 64, 679

L E B E N S L A U F

Am 15. November 1945 wurde ich, Eberhard Erwin Schäl, als Sohn des Oberregierungsrates Erwin Schäl und seiner Ehefrau Maria, geb. Groß, in Heidenheim a.d. Brenz geboren.

Nach der Einschulung im September 1951 besuchte ich dreieinhalb Jahre die Volksschule in Kaufbeuren und wechselte, infolge einer Versetzung meines Vaters, in die Stephansschule Bamberg über. Nach der 5. Klasse trat ich im September 1956 in das Humanistische Neue Gymnasium Bamberg ein und legte dort, nach neun Jahren, im Juli 1965 die Reifeprüfung ab.

Vom Oktober 1965 bis September 1967 leistete ich meinen Wehrdienst.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München mit dem Studium der Tiermedizin. Dies schloß ich ohne Universitätswechsel im Sommer 1972 mit dem Staatsexamen ab und erhielt die Bestallung als Tierarzt mit Wirkung vom 26.10.1972.

Die vorliegende Arbeit begann ich im November 1972 am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin im Fachbereich Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Frau Prof. Dr. B. Gedek möchte ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die mir jederzeit gewährte Aussprache herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr danke ich besonders für die mir bereitwillig gewährte Arbeitsmöglichkeit und sein stetes Interesse an meiner Arbeit.



